

# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI " FEDERICO II "**



Polo delle Scienze e delle Tecnologie  
Dipartimento delle Scienze Biologiche

## ***DOTTORATO IN BIOLOGIA AVANZATA XVIII CICLO***

### **Ruolo dei fattori di trascrizione Pbx1 e Pbx2 nella morfogenesi degli arti**

#### **Tutore**

Prof. Giuseppe Balsamo

#### **Candidata**

Giuseppina Di Giacomo

#### **Correlatore**

Prof. Luciano Gaudio

#### **Supervisore esterno**

Licia Selleri M.D., Ph.D

*Anno Accademico 2005/2006*

## **INDICE**

|  |        |
|--|--------|
| <b>CAPITOLO I: Sviluppo degli arti</b>   | pag.5  |
| 1.1 Induzione dello sviluppo degli arti  | pag.5  |
| 1.2 Asse di sviluppo antero-posteriore   | pag.6  |
| 1.3 Asse di sviluppo prossimo-distale  | pag.14 |
| 1.4 La Progress Zone   | pag.16 |
| 1.5 Asse di sviluppo dorso-ventrale  | pag.19 |
| 1.6 Coordinazione della crescita tridimensionale<br>degli arti lungo i tre assi di sviluppo                          | pag.20 |
| <br><b>CAPITOLO II: Proteine con omeodominio</b>   | pag.22 |
| 2.1 Proteine con omeodominio   | pag.22 |
| 2.2 Struttura degli omeodomini   | pag.23 |
| 2.3 Classificazione degli omeodomini   | pag.24 |
| 2.4 I fattori di trascrizione Pbx appartengono<br>alla classe di proteine con omeodominio TALE                       | pag.26 |
| 2.5 Funzioni, durante lo sviluppo, dei membri della<br>famiglia dei Pbx  | pag.26 |
| 2.6 Le proteine Pbx sono co-fattori Hox  | pag.27 |
| 2.7 Struttura cristallina dei complessi Hox-Pbx/Exd  | pag.28 |
| 2.8 Le proteine Pbx interagiscono con i componenti<br>del gruppo Meis  | pag.29 |
| 2.9 Regolazione e funzione dei dimeri Pbx-Meis   | pag.30 |
| 2.10 Le proteine Pbx esibiscono, in vitro, proprietà di<br>legame al DNA simili, ma differenti distribuzioni in vivo | pag.32 |
| <br><b>CAPITOLO III: Scopo della tesi</b>  | pag.33 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>CAPITOLO IV: Risultati</b>   | pag.34     |
| 4.1 L'assenza dei geni <i>Pbx1</i> e <i>Pbx2</i> causa difetti negli arti anteriori e posteriori sia a livello prossimale che distale   | pag.34     |
| 4.2 L'espressione di <i>Pbx1</i> e <i>Pbx2</i> nel mesenchima degli arti in sviluppo risulta essere dinamico e in parte complementare   | pag.35     |
| 4.3 Negli embrioni <i>Pbx1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Pbx2</i> <sup>+/-</sup> il processo di induzione degli arti e' alterato  | pag.36     |
| 4.4 Negli arti di embrioni <i>Pbx1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Pbx2</i> <sup>+/-</sup> l'iniziale patterning del mesenchima e' preservato   | pag.38     |
| 4.5 <i>Pbx1</i> e <i>Pbx2</i> sono necessari per la normale espressione di <i>Shh</i> nella ZPA   | pag.38     |
| 4.6 Negli arti <i>Pbx1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Pbx2</i> <sup>+/-</sup> la distribuzione dell'espressione dei geni <i>Hox</i> , prima e dopo l'induzione di <i>Shh</i> , e' alterata o assente | pag.40     |
| 4.7 Gli arti <i>Pbx1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Pbx2</i> <sup>+/-</sup> mostrano difetti prossimo-distali parzialmente mediati da alterate interazioni ecto/mesenchimali                         | pag.42     |
| 4.8 Alterazione precoce nel comportamento delle cellule dorso-ventrali negli arti posteriori <i>Pbx1</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Pbx2</i> <sup>+/-</sup>  | pag.43     |
| <br><b>CAPITOLO V: Discussione</b>  | <br>pag.45 |
| <br><b>CAPITOLO VI: Materiali e Metodi</b>  | <br>pag.49 |
| 6.1 Incroci   | pag.49     |
| 6.2 Purificazione di DNA genomico   | pag.49     |
| 6.3 PCR   | pag.50     |
| 6.4 Isolamento di plasmidi  | pag.50     |
| 6.5 Ibridazione <i>in situ</i>  | pag.50     |
| 6.6 Immunoistochimica   | pag.51     |

|  |            |
|--|------------|
| <b>6.7</b> Colorazione Alcian Blue-Alzarin Red   | pag.51     |
| <b>6.8</b> Chromatin Immunoprecipitations (ChIP) | pag.52     |
| <b>6.9</b> Colture cellulari e trasfezioni       | pag.52     |
| <br><b>CAPITOLO VII: Figure</b>                  | <br>pag.54 |
| <b>CAPITOLO VIII: Bibliografia</b>               | pag.75     |

## **CAPITOLO I**

### **SVILUPPO DEGLI ARTI**

#### **1.1 Induzione dello sviluppo degli arti**

Nel tentativo di chiarire i misteri dell'embriogenesi, gli scienziati hanno studiato lo sviluppo di organismi quali ricci di mare, nematodi, insetti, anfibi, uccelli e topi e vari organi come occhi, polmoni ed in particolar modo gli arti. La scelta di quest'ultimo quale modello di studio è ben comprensibile considerando che l'arto: 1) si sviluppa esternamente ed è quindi facilmente accessibile per essere manipolato sperimentalmente; 2) si compone di vari e ben definiti segmenti STILOPODIO (prossimale), ZUGOPODIO (intermedio), AUTOPODIO (distale); 3) è caratterizzato da una chiara polarità anatomica: antero-posteriore [AP] (dal 1° al 5° dito); prossimo-distale [PD] (dalla spalla alla punta delle dita); dorso-ventrale [DV] (dal dorso al palmo della mano).

La morfogenesi degli arti avviene lungo questi tre assi ed è regolata da tre centri organizzativi chiave, i quali producono i seguenti segnali primari: lo sviluppo AP è controllato da una popolazione cellulare sulla faccia posteriore del mesenchima dell'arto che secerne la proteina Shh; lo sviluppo DV richiede la localizzazione della proteina Wnt7a nell'ectoderma dorsale dell'arto che si verifica in seguito alla repressione della sua espressione sul lato ventrale ad opera del fattore di trascrizione En1 (Loomis et al. 1996; Pozz e Mc Mahon 1995); la crescita PD è regolata dalla cresta apicale ectodermica (AER: Apical Ectodermal Ridge) che produce le proteine della famiglia dei fattori di crescita di fibroblasti (Fgf: Fibroblast Growth Factor) che agiscono sul sottostante mesenchima dell'arto.

Lo sviluppo degli arti comincia quando le cellule mesenchimali proliferano dallo strato somatico della piastra mesodermica laterale (precursori dello scheletro degli arti) e dai somiti (precursori dei muscoli della gamba). In seguito, tali cellule si accumulano sotto il tessuto ectodermico formando una prominenza circolare,

l'abbozzo dell'arto. Nel topo, lo sviluppo dell'arto anteriore si rende evidente prima di quello dall'arto posteriore, intorno al 9° giorno di gestazione (Fig.1). Più specificamente, in stadi precoci di sviluppo, l'attivazione dei geni *Hox* nel mesoderma intermedio determina la secrezione di Fgf8 che stimola le adiacenti cellule della piastra mesodermica laterale a sintetizzare Fgf10 e ad acquisire specificità per lo sviluppo degli arti. Successivamente Fgf10 stimola una striscia antero-posteriore di cellule ectodermiche a divenire cellule della cresta ectodermica apicale. L'AER sintetizza diversi Fgf (Fgf4, Fgf8, Fgf9..etc.), alcuni dei quali inducono le cellule competenti a migrare verso gli appropriati territori e a formare l'abbozzo degli arti. Una volta costituitosi, l'abbozzo dell'arto aumenta rapidamente di dimensioni per formare tre compartimenti discreti: 1) STILOPODIO o compartimento prossimale, che contiene un osso, cioè l'omero o il femore rispettivamente dell'arto anteriore o posteriore; 2) ZUGOPODIO o compartimento intermedio, che contiene due ossa, radio/ulna e tibia/perone rispettivamente negli arti anteriori e posteriori; 3) AUTOPODIO o compartimento distale, che contiene un variabile numero di ossa (metacarpi e metatarsi) incluse al massimo cinque dita (Fig.2).

## **1.2 Asse di sviluppo antero-posteriore**

Trent'anni fa, mediante classici studi di trapianto tissutale all'interno dell'abbozzo degli arti di pollo, e' stata identificata una piccola regione di mesenchima posteriore contenente informazioni sufficienti per la strutturazione dell'asse antero-posteriore degli arti (Sounders e Gasseling, 1963). Questa regione mesenchimale, denominata "zona ad attività polarizzante" (ZPA) era capace di indurre duplicazioni a immagine speculare, quando trapiantato nel margine anteriore di un secondo abbozzo di arto, alterando così il normale modello delle dita da 2-3-4 (A→P) a 2-2-3-4; 3-2-2-3-4 o 4-3-2-2-3-4 (Fig.3). Inoltre, la riduzione del numero delle cellule della ZPA mediante esposizione della ZPA a dosi crescenti di raggi X o espanto delle cellule stesse dalla ZPA, comporta il mancato sviluppo del quarto dito extra, seguito dal terzo e infine dal secondo. E' stato stimato che lo stimolo massimo della ZPA e' ottenuto da solo un centinaio

di cellule della ZPA, sufficienti ad indurre l'intero pattern 4-3-2, mentre non più di sei cellule sono sufficienti a indurre un secondo dito extra (Tickle C. 1981). I risultati di tali esperimenti, in combinazione con le formule digitali ottenute col trapianto della ZPA in varie sedi, portarono alla conclusione che la ZPA poteva essere la sorgente di un morfogeno la cui diffusione costituisce un gradiente spaziale col suo punto più alto nel mesenchima posteriore dell'abbozzo dell'arto. Un passo avanti nella comprensione delle basi molecolari dell'attività della ZPA è stato fatto con la scoperta del gene *Sonic Hedgehog* (*Shh*) (Ridde et al. 1993), ortologo, nei vertebrati, del gene *Hedgehog* di *Drosophila* (*Hh*). Ridde e colleghi (1993), hanno dimostrato che la secrezione di Shh è sufficiente per l'attività polarizzante. L'esperimento che ha condotto a tali conclusioni consisteva nel transfettare con vettori virali contenenti il gene *Shh*, fibroblasti embrionali di pollo, che di norma non dovrebbero sintetizzare Shh. Il gene viene espresso e tradotto in questi fibroblasti i quali sono poi inseriti dove danno origine a duplicazioni digitali a immagine speculare simili a quelle indotte dal trapianto della ZPA. Più recentemente, esperimenti in cui al posto di fibroblasti infettati venivano impiantate beads contenenti Shh hanno mostrato dare luogo alle stesse duplicazioni (Lopez-Martinez et al. 1995). Pertanto, *Sonic Hedgehog* sembra essere il fattore attivo della ZPA.

Da queste scoperte scaturiscono due nuovi interrogativi. Primo: in che modo *Shh* viene espresso solo nella regione posteriore dell'abbozzo degli arti. Secondo: come agisce una volta espresso. Riguardo al primo quesito, nella regione posteriore dell'abbozzo degli arti sono presenti due fattori di trascrizione che non sono espressi nella regione anteriore e tali fattori potrebbero consentire soltanto alle cellule mesodermiche posteriori di esprimere il gene *Shh*. Charité e collaboratori hanno suggerito che la proteina Hoxb8 può essere critica nel fornire questa ristretta competenza. *Hoxb8* è normalmente espresso nella metà posteriore dell'abbozzo dell'arto anteriore del topo; tuttavia, quando espresso ectopicamente in tutto l'abbozzo dell'arto anteriore, sia il mesoderma anteriore che quello posteriore esprimono *Shh* creando due ZPA e duplicazioni di arto anteriori a immagine speculare. È importante sottolineare che, mentre *Hoxb8*

può svolgere un ruolo nel posizionamento della ZPA nell'ala/arto anteriore, esso non può spiegare l'induzione della ZPA nell'arto posteriore. Infatti, sebbene l'espressione ectopica di *Hoxb8* sia capace di indurre duplicazioni dell'arto posteriore, esso non è normalmente espresso in quella sede durante la formazione della ZPA.

Il secondo fattore di trascrizione espresso solo nel mesoderma posteriore dell'abbozzo dell'arto è *dHand*. Nei topi privi di *dHand*, *Shh* non è espresso nell'abbozzo degli arti e gli arti sono gravemente monchi. Inoltre, l'espressione ectopica di *dHand* nella regione anteriore dell'abbozzo degli arti di topi transgenici risulta nella formazione di una ZPA aggiuntiva, rivelata dall'espressione ectopica di *Shh* e dei suoi geni target e dalle conseguenti anomalie degli arti che includono polidattilia preassiale con duplicazione degli elementi scheletrici posteriori (Charité et al. 2000).

Analisi mutazionali nei topi hanno fornito informazioni sulla normale funzione di *Shh* nello sviluppo scheletrico degli arti. Gli arti di mutanti *Shh*<sup>-/-</sup> (Fig.4) hanno uno stilopodio normale, ma mostrano gravi difetti distali (Chiang et al. 1996). Nell'arto posteriore che è il più gravemente affetto, tibia e perone sono completamente assenti, sebbene il femore sia formato; nell'arto anteriore, un'estensione ossea dell'omero, può rappresentare sia un'ulna/radio fusa, che, semplicemente, un omero lungo e curvo. La presenza di un ampio dominio di morte cellulare nell'abbozzo degli arti *Shh*<sup>-/-</sup> (Chiang et al. 2001), suggerisce che *Shh* possa influenzare lo sviluppo scheletrico controllando la sopravvivenza cellulare. La via di trasduzione del segnale Shh è strettamente regolata da una complessa serie di interazioni (Fig.5). In assenza di Shh, il suo recettore Patched1 (Ptc1) reprime la proteina a sette domini transmembrana Smoothed (Smo) e il fattore di trascrizione a doppia funzione (attivatore/repressore) Gli3, l'ortologo nei vertebrati di *Cubitus interruptus* (Ci) in *Drosophila*, è proteoliticamente clivato nella sua forma di repressore. Il legame di Shh a Ptc inibisce la repressione su Smo e quindi il clivaggio proteolitico di Gli3, che viene prodotto nella sua forma di attivatore (Niswander L., 2003). Quindi, Shh regola l'espressione dei geni target controllando l'equilibrio delle forme di attivatore e



repressore di Gli3 (Wang et al. 2000). Il fenomeno di apoptosi osservato nell'abbozzo degli arti *Shh*<sup>-/-</sup> è probabilmente causato da un livello abnormemente elevato di Gli3R (prodotto a causa dell' assenza di Shh), poiché, rimuovendo un'allele di *Gli3* nei topi *Shh*<sup>-/-</sup> si riduce l'entità dell' apoptosi osservata, mentre, rimuovendo entrambi gli alleli di *Gli3* l' apoptosi non ha luogo. Quando nei topi *Shh*<sup>-/-</sup> il dosaggio di *Gli3* è ridotto, gli elementi scheletrici dello zugopodio e autopodio si sviluppano, presumibilmente perché ci sono ora sufficienti progenitori condrocitari disponibili per formare le condensazioni cartilaginee. Secondo le aspettative, i topi *Shh*<sup>-/-</sup>;*Gli3*<sup>+/-</sup> hanno meno dita (3-4) rispetto ai topi *Shh*<sup>-/-</sup>;*Gli3*<sup>-/-</sup> (6-11) (te Welscher et al. 2002) e, a giudicare dal numero delle falangi, tutte somigliano al primo dito. Le dita, invece, formate in assenza di entrambi i geni *Shh* e *Gli3*, sono morfologicamente indistinguibili le une dalle altre e di difficile classificazione. Tale osservazioni mostrano che *Shh*, oltre a regolare la sopravvivenza cellulare, svolge anche un ruolo nella strutturazione dell'autopodio conferendo identità digitale.

Sebbene molti studi convengano sull'esistenza di un morfogeno con distribuzione a gradiente, nessuno ha analizzato direttamente la cinetica di formazione del gradiente di Shh e le ipotizzate risposte soglia, né il potenziale contributo diretto delle cellule della ZPA nella formazione delle dita (Zeller R. 2004). Harfe e colleghi (2004) hanno cercato di dare una risposta a tali quesiti geneticamente, marcando tutte le cellule esprimenti *Shh* e le loro discendenti con la  $\beta$ -galattosidasi (*LacZShh*) e seguendone il destino sia dall'inizio dell'espressione di *Shh* che a tempi specifici durante lo sviluppo dell'abbozzo degli arti del topo. Un primo inaspettato risultato degli studi su tali popolazioni cellulari è stato che le cellule della ZPA non sono eliminate per apoptosi. Piuttosto, esse danno origine a discendenti che sia rimangono cellule della ZPA, sia determinano una popolazione di cellule discendenti che si espande distalmente e anteriormente non esprimendo a lungo *Shh*. Queste due popolazioni di discendenti *Shh* danno origine alle dita più posteriori (5 e 4), a parte del terzo dito e all'ulna. Il secondo dito, quindi, è il solo elemento scheletrico perduto nei topi *Shh*<sup>-/-</sup> che non deriva da cellule che hanno espresso

*Shh*. Questi risultati cambiano la rilevanza della teoria del morfogeno con distribuzione a gradiente poiché solo il secondo dito dipende da una stimolazione a lungo raggio da parte di *Shh* (Park et al. 2000). Per comprendere come sono determinate le identità delle dita dal 3° al 5°, alcuni studiosi hanno marcato irreversibilmente le cellule che esprimono *Shh* a tempi definiti piuttosto che dall'inizio della sua espressione. Questi studi cinetici hanno messo in evidenza che il destino delle cellule discendenti *Shh* è progressivamente ristretto posteriormente: le cellule discendenti che non esprimono *Shh* e sono nate prima (all'inizio dell'espressione di *Shh* al giorno gestazionale E9.5) contribuiscono allo sviluppo di tutte e tre le dita, mentre le cellule della ZPA che esprimono *Shh* più a lungo (fino al giorno gestazionale E11.5) e le loro discendenti, contribuiscono esclusivamente al quinto dito. Questi ed altri risultati, indicano che le cellule degli abbozzi degli arti acquisiscono in qualche modo una memoria cinetica del segnale di *Shh* ricevuto. In sintesi, il lasso cumulativo di tempo in cui la popolazione in espansione di cellule esprimenti *Shh* e le loro discendenti che non lo esprimono, sono esposte al segnale di *Shh* è essenziale nel differenziamento delle tre dita posteriori. Ciò è in netto contrasto con il modello del morfogeno con distribuzione a gradiente; infatti, la stimolazione a lungo raggio di *Shh* è necessaria solo per specificare il secondo dito, mentre il primo dito non dipende da *Shh*. In uno studio complementare, Ahn e colleghi (2004) hanno marcato le cellule dell'abbozzo degli arti di topo che rispondono allo stimolo di *Shh* attraverso l'analisi dell'attivazione trascrizionale di Gli1 (*LacZGli1*), diretto target di *Shh*. Tali studi hanno dimostrato senza dubbio che le cellule mesenchimali che danno origine alle dita dal 5° al 2° e all'ulna, rispondono al segnale di *Shh*, poiché mostrano l'attivazione del promotore Gli1. Questa prima conclusione è in accordo col fenotipo di arti *Shh*<sup>-/-</sup> e complementare agli studi di Harfe (2004). Benché si sia ipotizzato che la risposta cumulativa a *Shh* fosse più alta nel mesenchima posteriore (5° dito) e progressivamente più bassa verso le dita anteriori, tali esperimenti non hanno individuato specifiche soglie di risposta, come invece previsto dal modello del morfogeno a gradiente. Il meccanismo alla base della modulazione della risposta allo stimolo di *Shh* è, quindi, sconosciuto,

ma sembra che le cellule esposte ad elevati livelli cumulativi di stimolazione da Shh, perdano la loro sensibilità col tempo. Infine, nell'abbozzo di arti di topi privi del gene Gli2, il numero di cellule Gli1- $\beta$ -GAL-marcate, è ridotto e la loro distribuzione alterata, anche se è noto dalla letteratura che arti deficienti di Gli2 si sviluppano in modo normale (Bai et al. 2002). Questi risultati, insieme alle analisi di abbozzi di arti Gli3<sup>-/-</sup>, indicano che a determinare l'identità digitale non è la risposta positiva a Shh mediata da Gli1 e Gli 2 (Park et al. 2000), ma l'effetto inibitorio di Shh sulla formazione di Gli3R (Wang et al. 2000; te Welscher et al. 2002). In particolare, il dito 1, il più anteriore, è specificato da alti livelli di Gli3R in quanto lo stimolo a lungo raggio di Shh si ferma al dito 2, mentre il 5° dito, il più posteriore, necessita, per un corretto sviluppo, di elevati livelli di espressione di Shh e conseguentemente dell'assenza di Gli3R. Considerati insieme, tali studi indicano che la caratterizzazione dell'abbozzo degli arti nei Vertebrati avviene attraverso una memoria cinetica che integra la durata e l'intensità della stimolazione autocrina e paracrina che le cellule ricevono. Questo gradiente temporale caratterizza le dita posteriori (dal dito 3 al 5) e l'ulna/perone, mentre solo il 2° dito richiede un segnale a lungo raggio di Shh. Tali processi si verificano in combinazione con la modulazione della sensibilità cellulare e l'inibizione della formazione del Gli3R. Una molecola capace di regolare la cinetica temporale del segnale Shh e la modulazione della sensibilità mesenchimale a tale segnale potrebbe essere *Gremlin*, l'antagonista delle BMP (proteine morfogenetiche dell'osso), in quanto analisi mutazionali nel topo hanno dimostrato che è essenziale nello stabilire il feedback epiteliale-mesenchimale tra la ZPA e l'AER (Zuniga et al. 1999). Nell'abbozzo degli arti *Grm*<sup>-/-</sup> l'espressione di *Shh* è perduta prematuramente e la risposta mesenchimale al segnale di Shh è alterata, il che interferisce gravemente con la differenziazione delle dita posteriori (Michos et al. 2004).

Gli effetti della stimolazione di Shh sulla regione distale degli arti sono mediati, almeno in parte, dai geni al 5' *Hoxd* (i geni Hox posteriori appartenenti al cluster D: d9-d13) in quanto Shh previene la produzione di Gli3R, regolatore negativo della trascrizione dei suddetti geni *Hox*. Inoltre, induzione ectopica di *Shh* nel

dominio anteriore dell'arto comporta l'espressione ectopica degli *Hoxd* (Ipsizua-Belmonte et al. 1991; Riddle et al. 1993).

I geni *Hox* sono notoriamente importanti per la caratterizzazione di numerosi tessuti durante lo sviluppo dell'embrione. Nell'uomo e nel topo sono stati identificati 39 geni *Hox* organizzati in quattro cluster (a, b, c, d) e locati su quattro differenti cromosomi (Fig.6). Sui cromosomi essi seguono un ordine fisico colineare con l'asse cefalo-caudale degli organismi in crescita tale che i geni situati all'estremità 3' sono espressi prima e localizzati in domini più anteriori. Spostandosi in direzione 5', ogni gene successivo adotta un pattern di espressione progressivamente più tardivo e posteriore. I geni appartenenti ai quattro gruppi *Hox* giocano vari ruoli nella formazione degli arti, ma il pattern di espressione dei geni *Hoxa 9-13* e *Hoxd 9-13* suggerisce una loro specifica implicazione in tale processo. Inoltre, geni paraloghi di differenti clusters, tendono a mostrare ridondanza. In mutanti omozigoti per *Hoxa13* o *Hoxd13*, per esempio, sono evidenti solo malformazioni minori a livello dell'autopodio (Dolle et Al., 1993) e l'effetto risulta essere solo parziale a causa di una ridondanza con i loro paraloghi, anch'essi espressi nell'autopodio presuntivo, che compensano la funzione dei geni mutati. Al contrario, la perdita progressiva di tutti e quattro gli alleli (*Hoxa13*<sup>-/-</sup>; *Hoxd13*<sup>-/-</sup>) dimostra un effetto dose dipendente, al punto che in animali con suddetto genotipo non c'è quasi condrogenesi nell'autopodio (Fromental- Romain et Al., 1996). All'interno dell'abbozzo degli arti, i cluster *HoxD* e *HoxA* esibiscono patterns di espressione particolarmente complessi (Nelson et Al., 1996). Studi sulla dinamica di espressione del gene *Hox* negli arti in via di sviluppo, hanno rivelato che il pattern di espressione dei geni *Hoxd* al 5' (*d9-d13*) procede attraverso tre fasi distinte (Doboule D., 1994; Nelson et Al., 1996) (Fig.8). La fase I corrisponde alla strutturazione dello stilopodio presuntivo ed è caratterizzata principalmente dall'espressione di *Hoxd9* ed *Hoxd10* uniformemente in tutto il mesenchima dell'arto. L'inizio della fase II coincide con l'attivazione di *Shh* nella ZPA ed è caratterizzato da una espressione localizzata progressivamente più posteriore dei geni *Hox d9-d10-d11-d12-d13*. A questo stadio *Hoxd13* risulta essere il gene espresso più vicino alla ZPA ed è stato

dimostrato che l'attivazione ectopica di *Shh* induce l'espressione dei geni *Hoxd* in un simile gradiente da *d9* a *d13*. Il mesenchima che esibisce tale espressione sovrapposta dei geni *Hox d9-d13* durante la fase II è destinato a formare lo zugopodio. La fase III è, invece, caratterizzata da una completa inversione spaziale (colinearità inversa) dei geni *Hoxd*, tale che il gene *Hoxd9* risulta adesso quello la cui espressione è strettamente localizzata nella porzione posteriore dell'abbozzo dell'arto. Il mesenchima della fase III è destinato a formare l'autopodio. Over-espressione di *Shh* durante la fase III, induce l'espressione dei geni *Hoxd* esattamente nel suddetto ordine.

Così, mentre l'arto si sviluppa lungo l'asse prossimo-distale (PD), passando dalla fase II alla fase III, si verifica, nel tessuto mesenchimale, un cambiamento che altera la sua interpretazione molecolare del segnale di *Shh* proveniente dalla ZPA. Più recentemente, Zakany e colleghi utilizzando un'inversione e/o una delezione (*Hoxd1-d10*) nel cluster *HoxD* del topo, hanno trovato che un'iniziale espressione colineare di *Hox d11, d12 e d13* nell'abbozzo degli arti, determina una perdita di asimmetria. Gli autori propongono l'esistenza di una regione di controllo iniziale dell'arto (ELCR) (Fig.8), situata sull'estremo 3' del cluster *HoxD* che guida la regolazione (colineare) progressivamente più posteriore dei geni *Hoxd*. Successivamente, una volta attivato posteriormente, *Shh* controlla la trascrizione dei geni *Hoxd* attraverso la strategia della colinearità inversa (Kmita et al. 2002), probabilmente mediata da un enhancer a sede centromerica nel cluster denominato "regione globale centrale" (GCR) (Fig.8). *Shh* agirebbe quindi da collegamento tra la fase iniziale dell'espressione del gene *Hoxd* e la fase finale che si verifica nell'abbozzo distale dell'arto (le dita presuntive). Tali esperimenti indicano che l'iniziale restrizione posteriore dell'espressione dei 5' *Hoxd* è prerequisito necessario per la localizzazione posteriore di *Shh* e per la corretta caratterizzazione AP degli arti. Inoltre, l'analisi di embrioni di pollo mutanti *limbless*, indica che i geni 5' *Hoxd* possono essere espressi in un pattern polarizzato antero-posteriore anche in assenza dei segnali di *Shh* e dell'AER (Grieshammer et al. 1996; Noramly et al. 1996; Ras et al, 1996). In questi mutanti, quindi, altri fattori devono essere responsabili dell'espressione

polarizzata dei 5' *Hoxd*, fornendo la possibilità alternativa che l'espressione dei 5' *Hoxd* preceda l'iniziale attivazione dell'espressione di *Shh* nella regolazione della posizione della ZPA durante l'iniziale formazione degli arti. È da notare che l'over-espressione di *Hoxb8* al giorno di gestazione E10.5, conduce non solo alla formazione di una ZPA ectopica, ma induce anche un ampio dominio di espressione ectopica dei geni 5' *Hoxd* (Charité et al. 1994).

### 1.3 Asse di sviluppo prossimo-distale

La cresta ectodermica apicale (AER) è costituita da cellule colonnari strettamente stipate che corrono lungo il margine distale degli abbozzi d'arto (Fig.1). La sua formazione include essenzialmente tre fasi: 1) induzione; 2) migrazione; 3) compattazione e 4) regressione. L'induzione dell'AER è causata dall'espressione di *Fgf10* nel mesenchima dell'arto, il quale induce l'espressione di *Fgf8* nei precursori dell'AER. Tali cellule sono inizialmente distribuite in una regione relativamente ampia dell'ectoderma. Nel pollo, studi di marcatura cellulare indicano che i precursori dell' AER originano dall'ectoderma ventrale e dorsale (Altobelli et al. 1997), mentre nel topo gli studi più recenti indicano che i precursori dell' AER sono localizzati nell'ectoderma ventrale (Kimmel et al. 2000). I precursori dell'AER esprimenti *Fgf8* si concentrano all'estremo distale forse in seguito alla loro migrazione o ad una downregulation di *Fgf8* in cellule che non sono vicine al margine distale dell'arto, e si compattano a formare un epitelio colonnare. Studi su arti di topi mutati del gene *Engrailed* (*En1<sup>-/-</sup>*) o su arti in cui *En1* era stato over-espresso, hanno indicato che la compattazione richiede la formazione di un margine dorsale, uno intermedio e uno ventrale. Negli arti *En1<sup>-/-</sup>*, infatti, sembra che i margini ventrale e dorsale non siano adeguatamente formati e ciò dà esito ad un AER appiattita che si estende su un'ampia porzione dell'ectoderma ventrale dell'arto (Kimmel et al. 2000). È noto dalla letteratura che l'AER è necessario per la crescita prossimo-distale (PD) dell'arto; infatti, la rimozione dell'AER ad ogni stadio dello sviluppo, determina un arresto della crescita dell'arto. Quando l'AER viene escissa ad uno stadio più avanzato di sviluppo, e quindi quando molti elementi dell'arto sono già formati, la crescita

dell'arto cessa con troncamento ai livelli più distali, mentre quando l'escissione viene effettuata a stadi più precoci, lo sviluppo dell'arto cessa con troncamento a livelli più prossimali (Saunders, 1948; Summerbell, 1974) (Fig.9). La logica conclusione derivante da queste osservazioni è che l'arto si sviluppa attraverso una distalizzazione sequenziale. Inoltre, il trapianto di una seconda AER vicina all'originale conduce alla formazione di un arto soprannumerario e la sostituzione del mesoderma alare con il mesoderma di una zampa sotto l'AER alare, determina lo sviluppo di una zampa. Se mesoderma non di arto è trapiantato al disotto della AER, esso regredisce e lo sviluppo dell'arto cessa (Fig.10). Ciò indica che esiste un feedback positivo epiteliale/mesenchimale necessario per il mantenimento dell'AER. Inoltre, il mutuo scambio di AER tra abbozzi di arti in fase iniziale o avanzata, determina la formazione di singoli arti normali e ciò implica che l'AER non specifica gli elementi formati e che la sua influenza non cambia durante lo sviluppo. Tali esperimenti indicano quindi, che è il tipo di mesoderma che specifica il tipo di arto prodotto, mentre l'induttore (AER) sembra essere universale, non specie-specifico, ma indispensabile (Madsen 1984, Koussoulakos et al. 1990)

I fattori chiave per la formazione dell'AER sono i fattori di crescita di fibroblasti (Fgf). Quattro membri di questa famiglia sono specificamente espressi nell'AER, durante lo sviluppo degli arti, in un pattern dinamico e complesso. Inizialmente, l'ectoderma al disopra della piastra mesodermica laterale, esprime *Fgf8* e più tardi, nell'abbozzo degli arti, *Fgf4*, *Fgf9* e *Fgf17* sono espressi nella parte posteriore della cresta apicale. Ancora più tardi, quando le dita primordiali si stanno formando, l'espressione di *Fgf4* scompare dalla cresta negli abbozzi degli arti di polli e topi (Niswander e Martin, 1982), mentre l'espressione di *Fgf8* persiste delimitando l'estremità delle dita primordiali.

Le prime informazioni sulla natura molecolare dell' AER vennero pubblicate nel 1990, quando si osservò che, in arti di pollo, la sostituzione dell'AER con beads impregnate di Fgf (*Fgf2* o *4*), permetteva lo svolgersi di uno sviluppo PD normale (Niswander et al. 1993; Fallon et al. 1994), mentre l'applicazione di una bead impregnata di *Fgf8* nel fianco di un embrione di pollo (stadio 15) a livello del



somite 24, conduceva alla formazione di un arto soprannumerario. L'evidenza genetica che gli *Fgf* sono necessari per la formazione dell'AER si è, però, avuta solo di recente, quando Sun et al. (2000) hanno usato il sistema *Cre-LoxP* (*Msx2-Cre*), in topo, al fine di mutare *Fgf8* e *Fgf4* esclusivamente nell'AER. In assenza completa di questi prodotti genetici (*Fgf8*<sup>-/-</sup>;*Fgf4*<sup>-/-</sup>), gli arti non si formano, mentre l'inattivazione tardiva di *Fgf4* e *Fgf8* risulta nella produzione di tutti i segmenti prossimo-distali con gli elementi distali ridotti di numero e dimensioni.

#### 1.4 La Progress Zone

Gli esperimenti riguardanti la crescita degli arti in seguito alla rimozione dell'AER a stadi progressivamente più avanzati di sviluppo (Fig.9) hanno condotto a formulare l'ipotesi della "progress zone" (Summerball D. 1973). Secondo tale ipotesi, l'AER produce e rilascia sostanze (ora note essere *Fgf*) che diffondono per una distanza di circa 300 µm. Questa distanza prossimale all'AER si ritiene costituisca la progress zone (PZ). Le cellule di questa zona, sotto l'influenza di questi fattori, acquisiscono caratteri distali: proliferando, le cellule abbandonano la progress zone e, libere dall'influenza di questi fattori, iniziano a differenziare secondo l'informazione posizionale, formando strutture prossimali e distali: prima omero/femore, poi radio/tibia e ulna/perone, metacarpi e infine dita (Fig.11A). Il modello della progress zone è stato messo in discussione quando il lavoro di Dudley e colleghi ha suggerito l'esistenza di uno stadio di pre-specificazione che guida lo sviluppo morfologico dell'arto. Gli autori hanno dimostrato che una temporanea ma estesa morte cellulare si verifica in una regione del mesenchima all'estremità distale degli arti dopo la rimozione dell'AER e, più precisamente, che la rimozione dell'AER in polli negli stadi tra il 18 e il 22 crea una zona di morte cellulare relativamente costante, di 200 µm. Oltre lo stadio 24, la rimozione dell'AER non inficia la sopravvivenza cellulare, sebbene la proliferazione cellulare sia significativamente ridotta. La combinazione di esperimenti di marcatura cellulare con la rimozione dell'AER hanno indotto Dudley e colleghi a proporre due nuove idee. La prima è che le cellule che contribuiscono alla



formazione dei segmenti prossimo-distali si trovano in domini stratificati all'interno dell'abbozzo degli arti iniziali; la seconda è che il numero e il tipo di elemento dell'arto che si forma riflette, rispettivamente, la popolazione di progenitori prossimo-distali che si trova fuori dalla zona di morte cellulare e il loro stato di differenziamento precocemente specificato nello sviluppo dell'abbozzo dell'arto (Fig.11B). Utilizzando coloranti lipofilici per marcare la superficie di membrana di un gruppo di cellule, gli autori hanno evidenziato che cellule in differenti regioni dell'abbozzo iniziale degli arti contribuiscono ad un particolare segmento: allo stadio 19 la "fate map" così ottenuta mostra che le cellule che formano lo stilopode si trovano a 300 – 200  $\mu\text{m}$  dall'AER, mentre i precursori dello zeugopode e dell'autopode si trovano nel raggio, rispettivamente, di 200 – 100  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$  di distanza dall'AER. Pertanto alla luce di tali risultati Dudley e colleghi hanno proposto che i precursori dei tre moduli scheletrici base dell'arto sono prossimo-distalmente stratificati nell'abbozzo iniziale degli arti. Mentre negli stadi iniziali tutti i progenitori risiedono nella zona di morte cellulare e da ciò il grave troncamento degli arti conseguente alla precoce rimozione dell'AER, negli stadi più avanzati, le cellule più prossimali risiedono fuori dalla regione di morte cellulare, per cui il troncamento avviene più distalmente. Sebbene questi dati non confutino il modello della progress zone, essi forniscono una spiegazione assai plausibile degli esperimenti di rimozione dell'AER. Una importante differenza tra il modello della progress zone e il modello proposto da Dudley e colleghi, è la cronologia della specificazione PD cellulare: il modello della progress zone si basa su una specificazione PD progressiva che dipende dai fattori rilasciati dall'AER e secondo la quale le cellule prossimali sono specificate prima, seguite da una specificazione cellulare progressivamente più distale; al contrario, Dudley e colleghi suggeriscono che tutte le cellule sono specificate prossimo-distalmente all'interno dell'abbozzo iniziale degli arti. Inoltre, i dati di Dudley et Al. suggeriscono che solo il destino delle cellule e non il loro stato di differenziamento è pre-specificato. I loro studi non definiscono quando le cellule "vengono a conoscenza" di cosa stanno per formare. A tale riguardo è da

ricordare che il pattern di formazione delle dita può essere alterato ad uno stadio molto avanzato, anche dopo che si è formata la condensazione, e che il tessuto interdigitale sembra regolare questo pattern (Dahn et al. 2000). Lo studio di dei fenotipi di topi mutati per alcuni geni *Fgf* hanno fornito ulteriori informazioni circa lo sviluppo PD. In particolare, nei topi *Fgf8*<sup>-/-</sup>, gli elementi scheletrici prossimali, lo stilopodio, sono gravemente ridotti o perduti (Fig.12), mentre gli elementi distali sono formati e relativamente normali (eccetto che per la perdita delle dita 1 e 2), a causa, molto probabilmente, dell'attivazione di altri *Fgf* come *Fgf4* (Lewandowski et al. 2000; Moon et al. 2000). La perdita degli elementi prossimali e non di quelli distali è incompatibile col modello della progress zone, secondo il quale le cellule prossimali sono specificate per prime e le distali successivamente. Si potrebbe ipotizzare che le strutture prossimali si formino e vadano successivamente perdute, forse per morte cellulare. Fenomeni apoptotici, in effetti, si verificano nel mesenchima prossimale degli arti posteriori *Fgf8*<sup>-/-</sup> e potrebbero causare la perdita dei precursori dello stilopodio, ma tale spiegazione è poco convincente in quanto un dominio simile di morte cellulare prossimale è stato osservato anche negli arti anteriori *Fgf8*<sup>-/-</sup> che, però, sviluppano uno stilopodio normale. Lo stesso fenomeno apoptotico prossimale è anche presente negli arti anteriori *Fgf4*<sup>-/-</sup>;*Fgf8*<sup>-/-</sup> nei quali, inizialmente, *Fgf8* e *4* sono espressi temporaneamente (Sun et al. 2002). In tale condizione genetica, che potrebbe somigliare alla rimozione dell'AER poco tempo prima dell'inizio dell'espressione degli *Fgf*, il fenotipo degli arti che si osserva è caratterizzato dallo sviluppo normale dello stilopodio, da uno zugopodio in cui entrambi gli elementi sono più piccoli della norma (uno di essi, il radio, è colpito più frequentemente e spesso assente) e dall'autopodio formato da una o due dita complete, mentre le altre sono perdute. Ancora una volta, quindi, anziché un troncamento distale si osserva un pattern di sviluppo molto differente che non è facilmente spiegabile mediante il modello della progress zone. Un aspetto contrastante di questo studio è che nei topi *Fgf4*<sup>-/-</sup>;*Fgf8*<sup>-/-</sup> l'AER è ancora presente e continua ad esprimere altri geni *Fgf*, inclusi *Fgf9* ed *Fgf17*. È possibile che tali geni (e probabilmente altre molecole derivate dall'AER) siano

sufficienti a mantenere la vitalità e la crescita delle cellule distali, sebbene esse non siano capaci di ripristinare lo sviluppo degli arti posteriori.

### **1.5 Asse di sviluppo dorso-ventrale**

Quando si forma l'abbozzo degli arti, la caratterizzazione dorso-ventrale è regolata dall'ectoderma dell'arto. Ciò è stato inizialmente osservato in studi embriologici nei quali la rotazione dell'ectoderma di 180° rispetto al mesenchima, comporta una inversione di 180° delle strutture mesenchimali risultanti (Geduspan e McCabe, 1987). I geni chiave che regolano la caratterizzazione dorso-ventrale sono stati identificati mediante manipolazione genica nel topo ed esperimenti molecolari nel pollo. La caratterizzazione DV è coordinata dall'attività di *Engrailed1* (*En1*) nell'ectoderma ventrale dove reprime l'espressione di un altro gene, *Wnt7a*, la cui espressione risulta, quindi, localizzata esclusivamente nell'ectoderma dorsale (Logan et al. 1997; Loomis et al. 1996). Successivamente, *Wnt7a* induce l'espressione del fattore di trascrizione *Lmx1b* nel mesenchima dorsale (Chen et al. 1998; Riddle et al. 1995). La corretta localizzazione/espressione di *En1* e *Wnt7a* nell'ectoderma crea i margini che delimitano l'area di formazione dell'AER, ma non inficia sul suo processo di induzione. Infatti, embrioni di topo *En1*<sup>-/-</sup> o *Wnt7a*<sup>-/-</sup>, mostrano un pattern DV dell'abbozzo dell'arto perturbato che comporta la formazione di un' AER più ampia (Loomis et al. 1996; Park e McMahon, 1995) accompagnato, nei topi *En1*<sup>-/-</sup>, anche da un difetto di morfogenesi dell'AER che interessa il processo di compattazione delle cellule della parte ventrale. Tuttavia, l'espressione di *Fgf8* è indotta e la crescita prossimo-distale e il patterning sono relativamente normali, il che suggerisce che i meccanismi alla base dei suddetti processi sono a monte di questi segnali dorso-ventrali. La coordinazione tra il processo di induzione dell'AER e la caratterizzazione DV sembra dipendere dalle proteine morfogenetiche dell'osso, BMP (Bone Morphogenetic Protein) e forse da un differente membro della famiglia di ligandi Wnt. Circa il ruolo nella formazione dell'AER del segnale Wnt, esperimenti sugli arti di pollo suggeriscono che il segnale *Wnt3a*, tramite un meccanismo dipendente dalla  $\beta$ -catenina e dal *Lef1* è

necessario e sufficiente per indurre l'espressione di *Fgf8* (Kengaku et al. 1998). Mentre per quanto riguarda il ruolo delle BMP, mutazione del recettore BMP di tipo I (BMPRIA) nei topi e studi di perdita e recupero della funzione molecolare delle BMP nei polli, dimostrano che lo stimolo delle BMP è necessario e sufficiente per regolare sia il pattern DV che l'induzione dell'AER (Ahn et al. 2001; Pizette et al. 2001). Lo stimolo BMP, a livello dell'ectoderma ventrale, controlla positivamente l'espressione di *En1*, che è necessario, a sua volta, per localizzare *Wnt7a* nell'ectoderma dorsale. Pertanto BMP è a monte di *En1* nella caratterizzazione dorso-ventrale, ma è anche coinvolto nell'induzione di *Fgf8* nei precursori dell'AER. Inoltre, le BMP sembrano influenzare il processo di induzione dell'AER anche attraverso un differente gruppo di fattori di trascrizione, i membri della famiglia *Msx* (Pizette et al. 2001). Questi studi indicano, quindi, che la caratterizzazione DV e l'induzione dell'AER sono regolate in modo coordinato dalle BMP e suggeriscono che *En1* ed *Msx* funzionano indipendentemente l'uno dall'altro sotto il controllo delle BMP per mediare in modo differente questi due aspetti dello sviluppo degli arti. Pertanto, Wnt e BMP inducono e, molto probabilmente, influenzano il processo di posizionamento dell'AER all'interfaccia dorso-ventrale, ma le interrelazioni molecolari tra i meccanismi mediati da Wnt e BMP e/o come le loro attività convergono durante questo processo, rimangono ancora da determinarsi.

### **1.6 Coordinazione della crescita tridimensionale degli arti lungo i tre assi di sviluppo**

La caratterizzazione e la crescita tridimensionale degli arti è coordinata attraverso interazioni tra i centri di organizzazione degli arti e le molecole da essi prodotte (AER/*Fgf*; ZPA/*Shh*; DV/*En1-Wnt7a*) (Nisswander L., 2003).

L'AER è necessaria per l'espressione di *Shh* nella ZPA in quanto la rimozione dell'AER determina una rapida down regulation di *Shh* che può essere recuperata tramite impianto di una bead impregnata di *Fgf* (Laufer et al. 1994; Nisswander et al. 1994). Evidenze più dirette circa l'influenza degli *Fgf* nell'induzione dell'espressione di *Shh* sono fornite dallo studio di topi doppio

knockout *Fgf4/8* (Sun et al. 2002); in assenza di questi segnali dell'AER l'espressione di *Shh* non è indotta.

La ZPA, d'altro canto, risulta anch'essa vitale per il mantenimento della AER. *Shh*, infatti, mantiene l'espressione di *Fgf4* nell'AER agendo attraverso Formin (proteina codificata dal gene mutato nei topi *limbless*) nel mantenimento dell'espressione di *Gremlin*, antagonista delle BMP. Gremlin inibisce il segnale BMP e le BMP inibiscono l'espressione di *Fgf4* nell'AER (Zuniga et al. 1999). Così, in questa situazione di doppia inibizione, *Shh* regola positivamente *Fgf4*.

I segnali dorso-ventrali influenzano lo sviluppo lungo gli assi AP e PD. Rimozione dell'ectoderma dorsale o mutazioni a carico di *Wnt7a*, conducono alla riduzione o perdita dell'espressione di *Shh* e quindi perturbano lo sviluppo AP. Pertanto, la corretta espressione di *Wnt7a* mediata dall'espressione di *En1* nell'ectoderma ventrale e il corretto sviluppo dell'AER (in particolare l'espressione di *Fgf4*) risultano essere necessari nel mantenimento dell'espressione di *Shh* nella ZPA.

Per quanto riguarda lo sviluppo lungo l'asse PD e DV, è stato dimostrato che mutazioni a livello delle BMP conducono alla mancata induzione di *Fgf8* e all'assenza di AER. Inoltre, gli arti *BMPR1A*<sup>-/-</sup> appaiono bidorsali a causa della perdita di *En1* e dell'espressione ectopica di *Wnt7a* nell'ectoderma ventrale. In aggiunta, la regolazione mediata da BMP di questi due processi avviene in modo indipendente l'uno dall'altro: la via *En1/Wnt7a/Lmx1b* influenza la caratterizzazione DV (Ahn et al. 2001), mentre la regolazione della formazione di AER può coinvolgere i fattori di trascrizione *Msx* (Pizette et al. 2001). Inoltre, dopo la costituzione dell'AER, le BMP ne regolano negativamente le funzioni. In particolare verso il giorno di gestazione 12.5 le BMP reprimono l'espressione di *Fgf4* conducendo alla regressione dell'AER e al ritorno ad un epitelio cuboidale appiattito.

## CAPITOLO II

### PROTEINE CON OMEODOMINI

#### 2.1 Proteine con omeodomini

Le proteine con omeodominio contengono una sequenza altamente conservata di 61 aminoacidi, l'omeodominio (HD) che deriva il proprio nome dal fatto di essere stato per la prima volta identificato nei geni *omeotici* o geni *HOM* (così detti per la natura delle loro mutazioni) del complesso di *antennapedia* e *bitorax* di *Drosophila* (Krumlauf R, 1994). I geni omologhi degli *HOM* di *Drosophila* nei mammiferi sono i geni *Hox* (Fig.7). Il genoma umano e di topo contengono 39 geni che posseggono un'omeobox simile a quella del gene *antennapedia* di *Drosophila* e che codificano per dei fattori di trascrizione sequenza-specifici che funzionano da regolatori nella determinazione delle identità regionali lungo gli assi del corpo durante lo sviluppo embrionale.

I geni *Hox* dei Vertebrati sono organizzati su quattro *cluster* (A, B, C, D) locati su quattro differenti cromosomi. Come in *Drosophila* anche nei Vertebrati questi geni sono espressi lungo l'asse antero-posteriore dell'embrione in maniera colineare con la posizione che occupano lungo il cromosoma. Questo vuol dire che i geni posti all'estremità del 3' sono espressi più anteriormente e gli altri via via più posteriormente (Fig.6). Mentre il ruolo ancestrale dei geni *Hox* può essere di specificare l'identità regionale lungo l'asse corporeo AP, nei Vertebrati i geni *Hox* sono coinvolti in numerosi altri processi che includono la caratterizzazione dell'asse AP dell'abbozzo degli arti, l'ematopoiesi e l'organogenesi. Sebbene ogni proteina *Hox* esibisca specificità in vivo, come dimostrato da esperimenti di ripristino e perdita di funzione, in vitro, esse legano tutte la stessa sequenza bersaglio con bassa affinità. Questa paradossale osservazione pone il problema di come molteplici proteine con simili sequenze di legame al DNA, possano attivare e reprimere differenti geni bersaglio in vivo. Vari studi dimostrano che un'aumentata affinità e specificità di legame col DNA o un'aumentata attività

trascrizionale di tali proteine e' conferita dall'interazione con altre proteine/co-fattori. Come gli stessi geni *Hox*, i co-fattori degli *Hox* furono originariamente identificati dallo studio di mutazioni omeotiche in *Drosophila*. Il primo co-fattore degli *Hox* ad essere identificato e' stato *Extradenticle* (*Exd*) che riveste un ruolo fondamentale nel definire identità segmentale all'embrione di *Drosophila*. In particolare, mutazioni in *Exd* inducono trasformazioni omeotiche che pero' non alterano il normale *pattern* di espressione dei geni *Hox*, portando alla conclusione che *Exd* agisce, in qualche modo, in parallelo con i geni omeotici (Peiffe e Weischaus, 1990). Nei Vertebrati, l'omologo di *Exd* è *Pbx1* identificato a seguito della sua attivazione nella traslocazione cromosomica t (1;19) che determina la leucemia linfoblastica acuta pre-B (Kamps et al.1990; Nourse et al. 1990)

## **2.2 Struttura degli omeodomini**

Le analisi ad NMR 2D (Nuclear Magnetic Resonance) dell'omeodominio di Antennapedia complessato al DNA e la caratterizzazione della struttura cristallina del complesso DNA/omeodominio di Engrailed e Skipped, hanno fornito le prime informazioni circa la struttura di questi domini (Wolberger et Al., 1991 a/b).Dati strutturali indicano che gli omeodomini si ripiegano in tre  $\alpha$ -eliche: la prima e la seconda elica sono connesse da un esapeptide e orientate in modo anti-parallelo, mentre la terza elica e la sua estensione flessibile (detta anche quarta elica), sono perpendicolari alle prime due. L'elica 3 è l'elica di riconoscimento ed entra specificamente in contatto col solco maggiore del DNA. In tutti gli omeodomini contiene quattro residui conservati: Trp48, Phe49, Asn51 e Arg53:i residui polari Asn51 e Arg53 permettono l' interazione con il DNA in quanto l'Asn51 forma un ponte ad idrogeno con uno dei residui adeninici del sito ATTA di legame; gli altri due residui, invece, fanno parte di un core idrofobico e sono necessari all' elica di riconoscimento per raggiungere la corretta posizione rispetto all'intero omeodominio. Il core idrofobico è altamente conservato e ciò suggerisce che omeodomini differenti possono ripiegarsi in strutture tridimensionali simili. La regione N-terminale dell'omeodominio è flessibile ed in

grado di legare il solco minore del DNA mediante il residuo Arg5 che entra in contatto con la timina del sito di legame. La posizione 9 dell'elica 3 ha un ruolo cruciale nella scelta dei siti di riconoscimento; infatti, la sostituzione della Lys3 di Bicoid con un residuo Glu modifica la specificità di legame verso i siti bersaglio di Antennapedia. Benché la regione N-terminale sia la regione più divergente dell'omeodominio, essa non è sufficiente a conferire specificità di legame alle proteine con omeodominio. Infatti, proteine con omeodominio aventi differenti funzioni possono avere aminoacidi identici in posizione 9, suggerendo che altri meccanismi si sono sviluppati per incrementare la loro specificità di legame (Qian et al. 1992).

### 2.3 Classificazione degli omeodomini

Gli omeodomini possono essere suddivisi in almeno 20 classi in base a vari criteri quali: similitudini di sequenza nelle regioni affiancate, organizzazione in cluster genici, omologie con altri motivi e posizione degli introni. In base alla similitudine di sequenza e clusterizzazione cromosomica (che riflettono relazioni evoluzionistiche), le proteine contenenti omeodomini possono essere suddivise in due superclassi:

1) Geni della “**Complex super-class**”, sono geni omeotici clusterificati e includono i geni *HOM-C* di *Drosophila* e i geni *Hox* dei Mammiferi. Tale superclasse è stata suddivisa a sua volta in 6 classi sulla base dei corrispondenti geni in *Drosophila*: *Labial (Lab)*, *Proboscidea (Pb)*, *Deformed (Ddf)*, *Sex combs reducer (Scr)*, *Antennapedia (Antp)*, *Abdominal-B (Abd-B)*. I geni omeotici di *Drosophila* e i loro ortologhi nei mammiferi (geni *Hox*), condividono un'elevata omologia nell'omeodominio e, con l'eccezione della classe *Abd-B*, contengono un motivo esapeptidico con sequenza di riconoscimento (IYPWMK) localizzata all'estremo N-terminale dell'omeodominio.

2) Geni della “**Dispersed super-class**” non sono clusterificati e codificano per proteine aventi homeobox differenti e, spesso, anche domini proteici funzionali addizionali. Sono state identificate varie sottoclassi di seguito elencate:



- **Exapeptide class:** CAD; EMX e TCL/NEC, contiene un motivo esapeptidico che è presente anche nelle proteine omeotiche clusterificate (Gehring et Al., 1994);
- **Engrailed (En) class**, altamente conservata nell'evoluzione e caratterizzata da quattro segmenti proteici EH all'esterno dell'omeodominio, altamente conservati (Gehring et Al., 1994);
- **Paired class**, contiene due domini leganti il DNA, un omeodominio e una regione di 128 aminoacidi definita "paired domain". Alcune proteine contengono entrambi tali domini leganti il DNA, alcune solo il "paired domain", altre un omeodominio troncato. Inoltre alcune proteine includono anche un motivo octapeptidico addizionale (Gehring et Al., 1994).
- **POU class**, include diversi fattori di trascrizione ubiquitari come Pit1 e i fattori trascrizionali Oct1 e Oct2 con motivo di legame octamerico. Le proteine POU contengono, in aggiunta all'omeodominio POU, un dominio addizionale legante il DNA definito dominio POU-specifico (Gehring et Al., 1994). Tale dominio bipartito legante il DNA è diviso da un linker flessibile che permette alle proteine di adottare varie configurazioni monomeriche sul DNA.
- **CUT class**, un piccolo gruppo di proteine contenenti tre copie di una ripetizione "cut" di 80 aminoacidi a monte dell'omeodominio;
- **LIM class**, caratterizzata dalla presenza, in aggiunta all'omeodominio, di motivi LIM che sono alquanto variabili. Il LIM è un motivo di interazione proteina – proteina ed è necessario per l'interazione con le altre proteine contenenti omeodomini come le proteine POU e Otx;
- **ZINC FINGER class**, contiene sia un omeodominio sia un ben caratterizzato dominio di interazione proteina – proteina denominato ZINC FINGER. Le proteine ZINC FINGER sono del tipo C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> e sono strettamente correlate ai geni "gap" di *Drosophila*, *Kruppel* e *Hunchback*;
- **NK-2 class**, contiene un peptide conservato (CP) a valle dell'omeodominio;
- **TALE (Three Amino-Acids Loop Extension) class**, caratterizzata da un omeodominio atipico in quanto contenente tre aminoacidi extra formanti un loop

esterno tra le eliche I e II. In genere i tre aminoacidi sono prolina – tirosina – prolina (Burglin Tr, 1997). La funzione di questo loop è ancora sconosciuta.

## **2.4 I fattori di trascrizione Pbx appartengono alla classe di proteine con omeodominio TALE**

I geni *PBX* furono originariamente identificati clonando il prodotto della traslocazione cromosomica (1:19), ossia, fondendo parte del dominio bHLH del gene del fattore di trascrizione E2A all'omeodominio di PBX1. Questa traslocazione è presente nel 25% dei casi di leucemia linfoblastica acuta a cellule pre-B (PRE-B-ALL) da cui il nome pre-B cell homeobox (PBX) (Kamps et al. 1990; Nourse et al. 1990). Mentre la proteina di fusione E2A-PBX1 mostra grandi proprietà di attivazione trascrizionale, attivando vari geni in differenti tipi cellulari, le proteine PBX da sole non possiedono tale attività. Inoltre, la proteina di fusione oncogenica E2A-PBX, e non la sola PBX1, può attivare la trascrizione di geni reporter contenenti il sito di riconoscimento del legame di PBX (TGATGAT), suggerendo, quindi, che PBX1 non ha domini di attivazione trascrizionale (Lu et al. 1994). La famiglia dei *Pbx* include quattro geni: *Pbx1*, *Pbx2*, *Pbx3* e *Pbx4* (Selleri et al. 2001; Selleri et al. 2004; Rhee et al. 2004; Monica et al. 1991; Popperl et al. 2000). *Pbx1* e *Pbx3* hanno due forme proteiche diverse, una lunga ed una corta, dovute a processi di splicing alternativo (*Pbx1a* – *1b*, *Pbx3a* – *3b*), che differiscono nella regione C-terminali. Le proteine *Pbx* mostrano un elevato grado di omologia di sequenza, sebbene *Pbx4* sembri il gene più divergente. L'omologia tra le proteine *Pbx* si estende oltre l'omeodominio e include altre due regioni situate all' N-terminale, chiamate PBC-A e PBC-B domains. Tali domini sono risultati essere importanti nelle interazioni proteina–proteina ed in particolare mediano la dimerizzazione dei *Pbx* con le proteine Meis (Fig.14).

## **2.5 Funzioni, durante lo sviluppo, dei membri della famiglia dei Pbx**

Le proteine *Pbx* sono espresse in diversi tessuti sia nei topi adulti che nei feti mostrando differenti livelli di espressione a seconda del tessuto ed organo.

L'inattivazione genica di *Pbx1* nei topi conduce ad una letalità gestazionale tardiva (gli embrioni muoiono in utero al giorno E 15.5), accompagnata da grave ipoplasia di vari organi, presenza di timo e reni ectopici e aplasia della milza (Selleri et al. 2001; Brendolan et al. 2005). Il ruolo di *Pbx1* nella segmentazione è evidenziato dai molteplici difetti a carico dello scheletro assiale ed appendicolare prossimale degli embrioni *Pbx1*<sup>-/-</sup> (Selleri et al. 2001). La perdita di *Pbx1* è accompagnata, inoltre, da una trasformazione omeotica del secondo arco branchiale (BA2) nel primo (BA1), fenotipo simile a quello osservato in zebrafish, in cui è inattivato il gene *Pbx4* (*lazarus*) (Popperl et al. 2000; Selleri et al. 2001). I mutanti *Pbx1*<sup>-/-</sup> sono anche caratterizzati da un'anormale proliferazione e differenziazione dei condrociti che determina un processo di ossificazione precoce (Selleri et al. 2001). Gli effetti della perdita di *Pbx1* a livello scheletrico non mimicano con precisione l'inattivazione individuale di geni *Hox* suggerendo un possibile ruolo di *Pbx1* *Hox*-indipendente (Selleri et al. 2001).

Mentre i topi knockout per *Pbx2* non presentano alcun fenotipo (Selleri et al. 2004), i topi *Pbx3*<sup>-/-</sup> muoiono poco dopo la nascita a causa di insufficienza respiratoria causata dall'anormale attività dei neuroni inspiratori nel midollo antero-laterale (Rhee et al. 2004).

In zebrafish, l'inattivazione di *lazarus* (ortologo del *Pbx4* dei mammiferi) determina alterazioni nell'identità antero-posteriore a livello del romboencefalo e del tronco anteriore. I mutanti *lazarus* esibiscono, infatti, assenza dell'identità rombomerica nei primi quattro rombomeri; la fusione del primo e del secondo arco branchiale (caratteristica dei mutanti *Hoxa2*) (Riji et al. 1998; Popperl et al. 2000); trasformazione omeotica anteriore dei neuroni primari reticolo-spinali (Studer et al. 1996; Popperl et al. 2000). Inoltre, l'inattivazione sia di *Pbx4* che di *Pbx2*, conduce alla perdita totale della segmentazione del romboencefalo (Waskiewicz et al. 2002).

## **2.6 Le proteine Pbx sono co-fattori Hox**

La prima evidenza della funzione delle proteine Pbx quali cofattori-Hox nello sviluppo dei vertebrati, venne dall'identificazione di elementi regolatori accoppiati

Hox – Pbx nei promotori degli stessi geni *Hox* dei mammiferi. L'espressione dei geni *Hox*, soprattutto nel romboencefalo dei vertebrati, è altamente auto – e cross – regolata. Per esempio, nell'ambito del gruppo dei paraloghi 1, *Hoxa1* è necessario per il normale inizio dell'espressione di *Hoxb1*, mentre *Hoxb1* è necessario per il mantenimento della propria espressione (Poepperl et al. 1995; Studer et al. 1998). In questi ed altri esempi di regolazione genica Hox–dipendente nei vertebrati, l'elemento di riconoscimento degli Hox consta di un sito di legame accoppiato Hox/Pbx. Mutazioni a livello della sequenza di legame degli Hox o dei Pbx, previene l'espressione di geni reporter in topi transgenici (Ferretti et al. 2000; Popperl et al. 1995; Samad et al. 2004). Diverse osservazioni hanno dimostrato che l'interazione Hox-Pbx richiede due domini di Hox, l'omeodominio e l'esapeptide all' N–terminale e due strutture di Pbx: l'omeodominio ed un tratto conservato C–terminale di 15 aminoacidi. La sequenza esapeptidica (IYPWMK) o il suo motivo core (IYPWM) è necessario per il legame cooperativo al DNA delle proteine Hox e Pbx (Chang et al. 1995). Il motivo YPWM è stato trovato ad una distanza N–terminale variabile (5 – 50 aminoacidi) rispetto all'omeodominio nei paraloghi Hox da 1 a 8 e i residui di triptofano che mediano il legame cooperativo, sono stati ritrovati anche nei paraloghi 9 e 10 e in altri geni *Hox* non clusterificati. È interessante il fatto che l'espeptide sembra essersi coevoluto con l'omeodominio, suggerendo che queste due strutture funzionano insieme.

## **2.7 Struttura cristallina dei complessi Hox-Pbx/Exd**

Una significativa comprensione del modo in cui le proteine Hox lavorano è venuta dall'identificazione della struttura cristallina delle proteine Hox complessate al DNA ed al cofattore Exd/Pbx1 (LaRond –LeBlanc e Wolberger, 2003). Le due strutture cristalline risolte per Ubx-Exd-DNA e Hoxb1-Pbx1-DNA mostrano le tre eliche caratteristiche delle strutture dell'omeodominio. Il contatto col DNA per Exd e Pbx1 differisce da quello di molte proteine con omeodominio, risultando in un più debole legame. Il legame Hox-Exd/Pbx1 è dovuto alla presenza, esternamente al terminale amminico dell'omeodominio,

dell'esapeptide, mentre i due omeodomini (di Hox ed Exd/Pbx) si legano in posizione opposta rispetto alla doppia elica del DNA. L'esapeptide delle proteine Hox si inserisce in una "tasca" presente in Exd/Pbx la cui struttura e' in parte creata dalla presenza del domino TALE tipico di tali proteine (Burglin et al, 1997). La formazione di tali complessi aumenta enormemente l'attivita' trascrizionale degli Hox. Come precedentemente osservato, le proteine Hox di differenti gruppi paraloghi si associano in modo piuttosto simile alle proteine Exd/Pbx, ponendo l'interrogativo di come si ottenga, in vivo, la specificita' di legame necessaria affinche' differenti processi di sviluppo abbiano luogo. Una spiegazione potrebbe risiedere nella loro associazione con altri cofattori differenti da Exd/Pbx o, in alternativa, la lunghezza di legame tra l'esapeptide degli Hox e il proprio omeodominio, potrebbe influenzare la scelta da parte del complesso Hox/Pbx di quale sequenza e quindi quale gene target legare/attivare. Tale ipotesi e' supportata da recenti studi di cristallografia del complesso Hoxa9-Pbx1-DNA. Si e', infatti, evidenziato che la conformazione assunta dall'esapeptide presente nell'Hoxa9 e' differente da quella assunta dagli Hox piu' anteriori (LaRonde – LeBlanc e Wolberger, 2003) spiegando, cosi', la diversa specificita' di legame osservata per le proteine Hox posteriori comparate alle anteriori.

## **2.8 Le proteine Pbx intereagiscono con i componenti del gruppo Meis**

L'altra classe di partners di Hox appartenente alla superfamiglia TALE, comprende le proteine Meis che, a loro volta, includono, nei vertebrati, le famiglie Meis e Prep (Fig.13). Tali proteine sembrano avere importanti funzioni Pbx-dipendenti durante lo sviluppo embrionale. All'interno della sottofamiglia Meis, le similitudini di sequenza sono essenzialmente confinate all'omeodominio e a due regioni N-terminali, definite MH (MEIS homology) o HM (homology motifs), coinvolte nelle interazioni proteina-proteina con le proteine PBC (Fig.14). L'interazione Meis-Pbx non richiede i rispettivi omeodomini e, in aggiunta, la formazione del complesso precede il legame con il DNA, come dimostrato da analisi per delezione a carico della porzione N-terminale di entrambe le proteine.

In assenza di tali regioni il legame cooperativo col DNA dei complessi Pbx–Meis non ha luogo. Per quanto riguarda, invece, il legame dell'eterodimero al DNA, tale legame necessita della presenza di entrambi gli omeodomini.

Gli eterodimeri Pbx–Meis esibiscono, in vitro, la stessa specificità di legame. Essi si legano alle sequenze TGACAG o TGATTGACAG, che sono siti non riconosciuti dai dimeri Pbx–Hox, ma possono, in aggiunta, interagire con i siti bersaglio di Pbx–Hox (TGATTNNATNN) (Chang et al. 1997; Knoepler et al. 1997; Berthelsen et al. 1998; Jacobs et al. 1999; Ferretti et al. 2000). Inoltre, differentemente dai complessi Pbx–Hox, i dimeri Pbx–Meis non mostrano capacità nell'attivazione diretta della trascrizione (Berthelsen et al. 1998), lasciando aperta la questione della funzione di tali eterodimeri.

## **2.9 Regolazione e funzione dei dimeri Pbx-Meis**

L'attività di Exd/Pbx è regolata post-trascrizionalmente, da un meccanismo di traslocazione nucleare. In *Drosophila*, *Exd* è essenziale per la costituzione dell'asse prossimo-distale degli arti e, più precisamente, per la caratterizzazione della regione prossimale delle zampe del moscerino. Nel dominio prossimale dell'arto, infatti, Exd è soggetto a traslocazione nucleare e la sua funzione è quella di inibire l'attività di *decapentaplegic* (*Dpp*) e *Wingless* (*Wg*). Al contrario, nella regione distale dell'abbozzo degli arti, Exd è citoplasmatico, cioè in una forma inattiva, permettendo l'attivazione di *Dpp* e *Wg* ad opera di *Hh* (*Hedgehog*) (Consalez–Crespo et al. 1998). Il regolatore positivo della traslocazione nucleare è la proteina Homothorax (*Hth*). L'interazione tra *Hth* e *Exd* permette la traslocazione nucleare di quest'ultima e lo svolgimento della sua funzione trascrizionale (Kurant et al. 1998; Pai et al. 1998) evidenziando, quindi, un ruolo essenziale per queste due proteine nello sviluppo prossimale dell'arto di *Drosophila*. È stato inoltre dimostrato che l'espressione ectopica di *Hth* distalmente induce la localizzazione nucleare di *Exd*, bloccando lo sviluppo distale e risultando nella formazione di appendici tronche. La correlazione tra la caratterizzazione prossimo–distale dell'abbozzo degli arti e la localizzazione subcellulare, è conservata nell'evoluzione (Consalez–Crespo et al. 1998;

Capdevilla et al. 1999; Merchander et al. 1999). Gli orologi di Hth nei Vertebrati sono le proteine appartenenti alle famiglie Meis e Prep. E' stato, infatti, dimostrato che sia Meis1 che Prep1 possono sostituire Hth nell'induzione della traslocazione nucleare di Exd nei dischi imaginali di ghiandole salivari, antenne e zampe (Berthelsen et al. 1999; Jaw et al. 2000). Inoltre, l'over-espressione di *Meis1* o *Meis2* nell'area distale dell'abbozzo degli arti di pollo, produce prossimalizzazione o mutilazione delle strutture distali (Capdevilla et al. 1999; Merchander et al. 1999), mentre l'espressione ectopica di *Prep1* umano (PREP) nei dischi imaginali di *Drosophila* influenza debolmente lo sviluppo degli occhi, ma grandemente quello delle zampe e delle antenne.

Come Exd in *Drosophila* anche Pbx1, nell'abbozzo degli arti di topo, è citoplasmatico nella parte distale e nucleare solo nella parte prossimale per la presenza degli orologi di *Hth*, *Meis1* e *Meis2* (Consalez – Crespo et al. 1998; Merchander et al. 1999; Kilstrup–Nielsen et al. 2003). Entrambe le proteine, Exd e Pbx, contengono un segnale di localizzazione nucleare (NLS) e un segnale di export nucleare (NES). Il segnale NES è stato mappato nel dominio PBC, che è anche coinvolto nell'interazione con le proteine Meis. Poiché Meis non possiede un segnale NES, è stato proposto un modello secondo il quale l'eterodimerizzazione Exd/Pbx – Hth/Meis, induce la traslocazione nucleare dei dimeri Meis–Pbx, i quali sono poi trattenuti nel nucleo tramite il blocco del NES (Berthelsen et al. 1999). Tale blocco nel nucleo e' probabilmente causato da variazioni conformazionali, dovute all'interazione tra Pbx e Meis, che in qualche modo mascherano il segnale NES. Di recente, sono stati riportati due differenti meccanismi di controllo dell'export nucleare di Pbx1, in cui Meis non è coinvolto. Uno coinvolge l'interazione di due sequenze ricche di leucina nel dominio PBC–A con il recettore export CRM1. Il secondo, include l'attività della Protein Kinasi A (PKA) che media la fosforilazione di specifici residui di serina nel dominio PBC–B bloccando così l'export nucleare di Pbx1 (Kilstrup–Nielsen et al. 2003).

## **2.10 Le proteine Pbx esibiscono, in vitro, proprietà di legame al DNA simili, ma differenti distribuzioni in vivo**

Il differente splicing dei trascritti di Pbx1 e Pbx3 produce isoforme ad alto e basso peso molecolare di ciascuna di queste proteine, risultandone un totale di sei differenti proteine appartenenti alla famiglia dei Pbx: Pbx1a, Pbx1b, Pbx2, Pbx3a, Pbx3b e Pbx4 (Monica et al. 1991; Wagner et al. 2001). Curiosamente, le proprietà di legame col DNA di tali proteine appaiono molto simili. Mentre Pbx1, Pbx2 e Pbx3 (e tutte le loro isoforme) esibiscono, in vitro, la stessa capacità di legare una sottoclasse di proteine Hox (Chang et al. 1995), le proprietà trascrizionali delle varie isoforme sembrano essere distinguibili, come recentemente dimostrato per NcoR–SMRT, sulla base del differente reclutamento di complessi co-attivatori/co-repressori della trascrizione. Durante lo sviluppo dei mammiferi, l'espressione in vivo delle differenti proteine Pbx sembra essere temporalmente e spazialmente distinta per ciascun membro della famiglia Pbx (Schnabel et al., 2001; Selleri et al. 2004; Di Martino et al. 2001; Kim et al. 2002; Schnabel et al. 2004; Selleri et al. 2004; Rhee et al. 2004; Wagner et al. 2001) ed anche le diverse isoforme esibiscono una distribuzione preferenziale in distinti tessuti embrionali. Per esempio, Pbx1a è localizzato solo nel tessuto neurale (Schnabel et al., 2001), mentre Pbx1b è presente in modo predominante nel mesoderma, negli organi da esso derivati, nei siti di interazione mesenchimale/epiteliale (Schnabel et al. 2001; Selleri et al. 2001). Ciò nonostante, è stata anche osservata un'espressione sovrapposta di diversi *Pbx* in numerosi tessuti ed organi in via di sviluppo (Schnabel et al. 2001; Selleri et al. 2001; Kim et al. 2002; Selleri et al. 2004; Rhee et al. 2004; Wagner et al. 2001; Di Giacomo et al. in press).



### CAPITOLO III

#### SCOPO DELLA TESI

La famiglia dei *Pbx* include 4 geni: *Pbx1*, *Pbx2*, *Pbx3* e *Pbx4* (Selleri et al. 2001; Selleri et al. 2004; Rhee et al. 2004; Monica et al. 1991; Popperl et al. 2000). E' stato dimostrato che *Pbx1* e' necessario durante l'organogenesi e lo sviluppo dello scheletro sia assiale che appendicolare (Selleri et al, 2001). In particolare topi knockout per *Pbx1* mostrano difetti morfologici a carico dei cingoli scapolari e pelvici, dello sviluppo dello stilopodio sia anteriore che posteriore (omero e femore), mentre la regione distale degli arti (zugopodio ed autopodio) non sembra essere affetta. Al contrario dei *Pbx1*<sup>-/-</sup>, embrioni deleti dei geni *Pbx2* o *Pbx3* non mostrano alcun difetto scheletrico (Selleri et al.2003; Rhee et al. 2004). Durante il mio dottorato ho cercato di comprendere se il fenotipo scheletrico appendicolare ottenuto a mezzo della perdita di *Pbx1* potesse in qualche modo essere influenzato dalla perturbazione del dosaggio genico degli altri membri della famiglia dei *Pbx*. A tale scopo abbiamo prodotto ed incrociato topi doppi eterozigoti *Pbx1*<sup>+/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/-</sup> , per generare una progenie con differenti genotipi mutanti per entrambi i geni.

## CAPITOLO IV

### RISULTATI

#### 4.1 L'assenza dei geni *Pbx1* e *Pbx2* causa difetti negli arti anteriori e posteriori sia a livello prossimale che distale

Al fine di determinare se i difetti nella caratterizzazione e nello sviluppo scheletrico causati dalla perdita di *Pbx1* sono esacerbati e/o modificati, riducendo il dosaggio di altri membri della famiglia, come *Pbx2*, abbiamo prodotto topi doppi eterozigoti *Pbx1*<sup>+/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/-</sup> ed incrociati per generare una progenie con differenti genotipi mutanti per entrambi i geni. Difetti a carico dello scheletro assiale ed appendicolare sono stati evidenziati solo in embrioni aventi genotipo *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/+</sup> (Selleri et al. 2001), *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/-</sup> e *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>-/-</sup>. Gli embrioni doppi mutanti omozigoti, *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>-/-</sup>, muoiono al giorno di gestazione E9.5-10.5 affetti da difetti multipli di organogenesi nonché da completa assenza di arti (Fig.17). Per tale ragione la nostra analisi è stata ristretta agli embrioni *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/-</sup> (da qui in poi definiti come *Pbx1/2 mut* o *mut*) i quali sopravvivono fino al giorno di gestazione E13.5. Essi presentano un fenotipo caratterizzato da una forte esacerbazione del fenotipo assiale (Fig.16) ed appendicolare (Fig.15) ottenuto negli embrioni *Pbx1*<sup>-/-</sup>, nonché dalla presenza di nuovi fenotipi scheletrici a carico soprattutto della regione distale degli arti posteriori (Fig.15). Lo sviluppo degli arti anteriori e posteriori dei *Pbx1/2mut* sembra essere affetto diversamente; infatti, mentre al giorno di gestazione E9.5 gli arti anteriori sono già morfologicamente perturbati, gli arti posteriori fino al giorno E10.5 appaiono morfologicamente normali anche considerando il mezzo giorno (E0.5) di ritardo nel consueto sviluppo degli arti posteriori verso quelli anteriori (Fig.17). Analisi morfologiche al giorno E13.5 mostrano, invece, evidenti difetti a carico di entrambi gli arti. Più specificamente (Fig.15), l'arto anteriore è caratterizzato da uno zugopodio più corto e da un autopodio ipoplastico, mentre l'arto posteriore risulta essere tronco della parte

distale. In particolare al giorno di gestazione E12.5 l'espressione di Sox9 (marker per la condensazione mesenchimale) evidenzia una perturbazione del processo di condensazione mesenchimale a livello dell'arto sia anteriore che posteriore: l'arto anteriore mostra la presenza di sole tre condensazioni mesenchimali delle dita primordiali, mentre nell'arto posteriore tali condensazioni sono del tutto assenti (Fig.18 a-d). Analisi di preparazione scheletriche (colorazione con Alcian Blue) di embrioni *Pbx1/2 mut* al giorno E12.5 e E13.5, mostrano e confermano la presenza di difetti a carico della regione prossimale e distale di entrambi gli arti (Fig.18 e-l). In particolare, gli arti *Pbx1/2mut* anteriori, al giorno E13.5 (Fig.18 i-j) sono caratterizzati dalla presenza di una scapola morfologicamente perturbata e fusa ad una condensazione cartilaginea che, presumibilmente, rappresenta una duplicazione della testa omerale. L'omero risulta essere più spesso e contorto con una protuberanza cartilaginea che mimica una tuberosità deltoidea ipertrofica. Inoltre, mentre lo zugopodio sembra essere solo moderatamente affetto, l'autopodio manca delle dita 1 e 5 e di alcune ossa metacarpali.

A livello degli arti posteriori (Fig.18 k-l), gli embrioni *Pbx1/2mut* sono invece, caratterizzati da un cingolo pelvico avente un unico elemento cartilagineo reminiscenza, probabilmente, dell'ischio; dall'assenza, nella parte zugopodiale, della fibula e dalla completa assenza dell'autopodio eccetto la presenza, non sempre riscontrata, di un sigolo rudimento digitale.

#### **4.2 L'espressione di *Pbx1* e *Pbx2* nel mesenchima degli arti in sviluppo risulta essere dinamico e in parte complementare**

Studi di ibridazione *in situ* sono stati effettuati mediante l'utilizzo di sonde ad RNA specifiche per *Pbx1* e *Pbx2* su embrioni wild type, al fine di determinare le rispettive espressioni negli arti embrionali in sviluppo (Fig.19). Al giorno di gestazione E9.5 *Pbx1* risulta espresso nel fianco e nella regione prossimale dell'abbozzo degli arti sia anteriori che posteriori. Al contrario, allo stesso tempo gestazionale, *Pbx2* è espresso in tutto il mesenchima degli arti con intensità maggiore nella regione distale. Continuando la crescita dell'abbozzo dell'arto (ad E10.5), i trascritti di *Pbx1* rimangono nel mesenchima prossimale degli arti

anteriori e posteriori, con un'espressione maggiore nel dominio anteriore. Anche l'espressione di *Pbx2* rimane distale, ma forma un collare che circonda l'area mesenchimale più centrale dell'abbozzo degli arti anteriori e posteriori, come confermato da reazioni di immunoistochimica (Fig.21 HL a–b). Al giorno E11.5 l'espressione di *Pbx1* e *Pbx2* cambia dinamicamente in quanto entrambe sono ristrette nel mesenchima prossimale anteriore e posteriore dell'autopodio (Fig.19). Dal giorno E12.5, l'espressione di *Pbx1* e *Pbx2* è perduta anteriormente e posteriormente e localizzata negli spazi interdigitali dell'autopodio degli arti anteriori e posteriori, come confermato dalla doppia ibridazione *in situ* con *Msx1* (marker interdigitale). Infine, la presenza di *Pbx1* (Fig.20) e *Pbx2* (Fig.21) è stata riscontrata nella superficie ectodermica che ricopre entrambi gli abbozzi degli arti, inclusa la regione della cresta ectodermica apicale (AER). Tali risultati suggeriscono la presenza di un “*Pbx code*” lungo gli assi AP e PD con funzioni *Pbx1*/*Pbx2* sovrapposte e complementari.

Le stesse analisi di espressione sono state effettuate in embrioni *Pbx1*<sup>-/-</sup> utilizzando sonde ad RNA *Pbx2*-specifiche e viceversa. I risultati ottenuti dimostrano che mentre l'espressione di *Pbx1* negli arti *Pbx2*<sup>-/-</sup> sembra essere leggermente più diffusa in senso PD, quella di *Pbx2* resta invariata in arti *Pbx1*<sup>-/-</sup> suggerendo quindi la mancanza di un meccanismo cross-regolativo tra questi due geni.

#### **4.3 Negli embrioni *Pbx1*<sup>-/-</sup>;*Pbx2*<sup>+/-</sup> il processo di induzione degli arti è alterato**

Una delle indicazioni più precoci circa l'avvenuta induzione del processo di sviluppo degli arti deriva dall'analisi dell'espressione di *Fgf10* nel mesoderma laterale. È stato dimostrato, infatti, che topi knockout per *Fgf10* mostrano completa assenza degli arti anteriori e posteriori (Semine et al. 1999). Considerando i severi difetti di crescita negli arti *Pbx1/2*mut, abbiamo esaminato l'espressione di *Fgf10* per evidenziare eventuali problemi a carico del processo induttivo. Al giorno E9.5 gli arti anteriori *Pbx1/2*mut sono risultati completamente privi di segnale *Fgf10*, mentre analisi effettuate su embrioni mutanti al giorno

E10.5 hanno mostrato un'espressione di *Fgf10* ridotta sia negli arti anteriori che posteriori (Fig.22) suggerendo, quindi, un probabile ritardo nel processo di induzione degli arti.

In letteratura è riportato che *Tbx5* e *Tbx4*, membri della famiglia dei fattori di trascrizione T-box, sono marcatori specifici rispettivamente degli arti anteriori e posteriori, e che la loro inattivazione determina un'alterazione dell'espressione di *Fgf10*. In realtà mentre nei topi *Tbx5*<sup>-/-</sup>, *Fgf10* non è mai espresso nella futura regione dell'arto anteriore (Argwal et al. 2003), negli embrioni *Tbx4*<sup>-/-</sup>, l'induzione e l'iniziale caratterizzazione dell'arto posteriore appaiono normali, ma in seguito l'arto non è in grado di svilupparsi ulteriormente e l'espressione di *Fgf10* è down-regolata. L'analisi degli arti posteriori *Pbx1/2mut* con *Tbx4* al giorno E10.5, ha rivelato un pattern di espressione relativamente normale di tale gene in confronto al wild type (Fig.23), indicando che l'iniziazione dell'arto posteriore negli embrioni *Pbx1/2mut* è preservata, come confermato dalle analisi della morfologia generale. Invece, le analisi dell'espressione di *Tbx5* negli arti anteriori *Pbx1/2mut* al giorno E10.5, hanno mostrato un'espressione di questo gene assai ridotta.

Si è ipotizzato che esista un feedback positivo essenziale per lo sviluppo degli arti tra *Fgf8* nell'AER ed *Fgf10* nel mesenchima. Analisi di espressione di *Fgf8*, effettuate su embrioni *Pbx1/2mut* al giorno E9, hanno mostrato che *Fgf8* è quasi assente negli arti anteriori del mutante a questo stadio, mentre al giorno E10.5 è ridotto ed anteriorizzato (Fig. 27). Allo stadio E10.5 gli arti posteriori *Pbx1/2mut* mostrano un'espressione antero – posteriore ridotta di *Fgf8* (Fig. 27). Questi risultati, specialmente l'espressione di *Tbx4* e *Tbx5*, possono aiutare a spiegare i differenti difetti morfologici osservati nell'arto anteriore *Pbx1/2mut* rispetto all'arto posteriore. Infatti, mentre l'arto posteriore sembra avere crescita normale fino al giorno E10.5, o al massimo essere leggermente più piccolo rispetto al wild type, l'arto anteriore appare deforme e in ritardo nello sviluppo già ad E9-9.5 a causa, probabilmente, della ridotta espressione di *Tbx5*.

#### **4.4 Negli arti di embrioni *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/-</sup> l'iniziale patterning del mesenchima e' preservato**

E' stato dimostrato che prima dell'induzione dell'espressione di *Shh* (E9.5-10) esiste un meccanismo di mutuo antagonismo tra *Gli3* ed *Alx4*, espressi nel dominio anteriore dell'abbozzo degli arti, e *dHand* espresso, invece, nel dominio posteriore (te Welscher et al. 2002). Tali interazioni dividono il mesenchima degli arti in sviluppo in un dominio anteriore ed uno posteriore. Analisi effettuate in arti posteriori *Pbx1/2mut* attraverso la metodica dell'ibridazione *in situ* con sonde specifiche per i suddetti geni, rivelano livelli di espressioni di *Gli3*, *dHand* ed *Alx4* comparabili a quelli ottenuti nei wild type (Fig.28A). Inoltre, benché difetti morfologici a carico dell'arto anteriore dei *Pbx1/2mut* siano già evidenti al giorno E10, l'espressione di *Gli3*, *dHand* e *Alx4* risulta essere normale.

E' noto dalla letteratura che *Meis1* e *Meis2* sono geni coinvolti nella specificazione del mesenchima prossimale. Analisi di espressioni di tali geni negli arti *Pbx1/2mut* mostrano un livello di espressione per *Meis2* normale indicando che lo sviluppo lungo l'asse PD almeno fino al giorno E11 procede normalmente (Fig.28B).

Tali risultati dimostrano che l'iniziale patterning del mesenchima degli arti *Pbx1/2mut*, nella fase precedente all'induzione di *Shh*, e' preservata.

#### **4.5 *Pbx1* e *Pbx2* sono necessari per la normale espressione di *Shh* nella ZPA**

Data la similitudine tra il fenotipo dell'arto posteriore *Pbx1/2mut* e quello riportato per embrioni deficienti del gene *Shh* (Chiang et al. 2001; Kraus et al. 2001), abbiamo esaminato l'espressione di *Shh* negli arti *mut*. Nell'arto posteriore di embrioni *Pbx1/2mut*, in tutti gli stadi analizzati (E9.5-13.5), la presenza di *Shh* non e' mai stata rilevata (Fig.25A). Tale assenza non può essere attribuita né ad una globale down-regolazione di *Shh*, né ad un ritardo nello sviluppo posteriore dell'embrione *mut*, in quanto l'espressione di *Shh* e' preservata a livello della cloaca e della notocorda (Fig.25C). Negli arti posteriori *Pbx1/2mut* studi di analisi dei livelli di espressione di *Ptc* e *Gli1*, noti essere marker dell'attività di *Shh*,

suggeriscono che se espressione di *Shh* esiste nella regione posteriore dell'arto, essa potrebbe essere solo minima e transiente tale da non poter essere detectata mediante ibridazione *in situ* (Fig.28B). D'altra parte, analisi di espressione dei geni *Gremlin* (Scherz et al. 2004), *dHand* e *Gli3* (te Welscher et al. 2002) a giorni gestazionali piu' tardivi (E10.75-11) (Fig.28C) confermano l'ipotesi della completa assenza di *Shh* negli arti posteriori *mut* in quanto il pathway di espressione di *Grm* e' posteriorizzato mentre quello di *Gli3* e *dHand* mimica quello osservato negli embrioni *Shh*<sup>-/-</sup> (Chiang et al. 2001) e *HoxA*<sup>-/-</sup>; *HoxD*<sup>-/-</sup> (Kmita et al. 2005). Contrariamente a quanto riscontrato nell'arto posteriore *Pbx1/2mut*, nell'arto anteriore l'espressione di *Shh* e' presente anche se ridotta (Fig.25B), cosi' come l'espressione di *Ptc* e *Gli1*, indicando che l'assenza di *Shh* e' specifica per l'arto posteriore. Tali risultati suggeriscono che *Pbx1* e *Pbx2* sono geni necessari durante lo sviluppo dell'arto posteriore affinche' l'espressione di *Shh* sia indotta.

La mancata espressione di *Shh* negli arti posteriori *Pbx1/2mut* risulta interessante data la normale espressione, invece, di *dHand*, noto essere nella cascata genica a monte rispetto a *Shh* e da alcuni considerata la molecola chiave per l'induzione di *Shh* (Charite' et al. 2000). Abbiamo quindi analizzato l'espressione di *Pbx1* e *Pbx2* in embrioni *dHand*<sup>-/-</sup> (Fig.27) e l'ottenimento di un normale pathway di espressione per questi due geni a livello degli arti, suggerisce l'esistenza di due meccanismi regolativi di *Shh* paralleli: uno *dHand*- e l'altro *Pbx1/2*- dipendente.

Poiche' evidenze supportano l'idea che *dHand*, *Shh* e gli *Hox* formino un loop regolativo durante lo sviluppo degli arti, dove *dHand* e' posizionato sia a monte che a valle rispetto a *Shh*, abbiamo cercato di comprendere se un simile meccanismo potesse esistere per *Pbx1/2* e *Shh*. Abbiamo quindi analizzato, in arti sia anteriori che posteriori *Shh*<sup>-/-</sup>, l'espressione di *Pbx1* e *Pbx2* che (Fig.26), dispetto all' anormale morfologia e ad una riportata apoptosi distale (Chiang et al. 2001), risulta essere invariata, escludendo, quindi, l'esistenza di un meccanismo cross-regolativo tra *Shh* e *Pbx1/2*.

#### **4.6 Negli arti *Pbx1*<sup>-/-</sup>;*Pbx2*<sup>+/-</sup> la distribuzione dell'espressione dei geni *Hox*, prima e dopo l'induzione di *Shh*, e' alterata o assente**

Studi recenti suggeriscono che la corretta espressione dei geni al 5' *Hox* nel mesenchima degli arti e' cruciale per l'attivazione di *Shh* e per la specificazione degli assi di sviluppo AP e PD (Zakany et al. 2004; Kmita et al. 2005). Poiche' negli arti *Pbx1/2mut* osserviamo assenza (o riduzione nel caso dell'arto anteriore) dell' espressione di *Shh*, abbiamo analizzato l'espressione dei geni *Hox* al 5' appartenenti al cluster *A* e *D*. Nonostante la morfologia piuttosto normale degli arti posteriori *Pbx1/2mut* al giorno E10.25-10.5, l'espressione dei geni *Hox* analizzati e' risultata, a tale stadio di sviluppo, ridotta o assente (Fig.29). Gli stessi geni negli arti anteriori *mut* (caratterizzati gia' al giorno E9.5 da difetti nel processo di sviluppo), mostrano, invece, un pathway di espressione leggermente up-regolato, eccetto per i geni *Hoxa13* e *Hoxd13* che sono completamente assenti (Fig.30). Tali risultati suggeriscono che il controllo degli *Hox* ad opera di *Pbx1/2* si basa su meccanismi complessi ed arto specifici.

Considerando i difetti autopodiali osservati negli arti *Pbx1/2mut* e l'ipotizzato loop regolatorio nel quale gli *Hox* attivano *Shh* e questo a sua volta regola il patterning delle dita attraverso la strategia della colinearita' reversa degli *Hox* al 5', abbiamo analizzato l'espressione degli *Hox* al 5' ai giorni piu' tardivi (E11.5). Negli arti posteriori *Pbx1/2mut*, l'espressione dei geni *Hox* posteriori appartenenti al cluster *D* e' ridotta anteriormente, mentre l'espressione di quelli appartenenti al cluster *A* e' invariata (Fig.31B). L'alterazione dei livelli di espressione di *Hoxd9-d13* riscontrata negli arti *mut* e' simile a quella riportata per i mutanti *Shh*<sup>-/-</sup> (Chiang et al. 2001). Negli arti anteriori *Pbx1/2mut*, invece, l'espressione di tali geni risulta essere pressocche' normale, con una leggera riduzione anteriore dei geni *Hoxd11* e *Hoxd13* (Fig.31A). Tale risultato e' in accordo con la ridotta espressione di *Shh* riscontrata negli arti anteriori *Pbx1/2mut*.

Per verificare se l'espressione di *Shh* e' direttamente regolata dalle proteine *Hox* e *Pbx*, abbiamo eseguito analisi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) su abbozzi di arti anteriori e posteriori di topo al giorno E10.5, usando antisieri specifici contro *Hoxd10* e *d13* (Fig.32A). I risultati ottenuti dimostrano che le



proteine Hox testate sono effettivamente capaci di legare una sequenza locata 1Mb dal promotore di *Shh*. E' stato dimostrato che mutazioni di tale sequenza conducono allo stesso fenotipo osservato negli embrioni *Shh*<sup>-/-</sup> suggerendo quindi che tale enancher (*ShhE*), evolutivamente conservato, dirige la corretta espressione spazio-temporale di *Shh* negli arti del topo (Lettice et al. 2003). Studi di immunoprecipitazione, usando un antisiero contro tutte le isoforme di Pbx, hanno inoltre dimostrato che anche le proteine Pbx sono capaci di legare in vivo questo elemento di regolazione (Fig.32A). La specificita' di legame degli anticorpi testati e' stata verificata attraverso la mancata amplificazione di una regione genomica locata a monte del *ShhE* (Fig36).

Al fine di determinare quale componente della famiglia dei Pbx fosse quello capace di legare l'enancher di *Shh*, abbiamo effettuato esperimenti di doppia ibridazione *in situ* utilizzando arti posteriori di topi wild type al giorno di gestazione E10 e sonde specifiche per *Pbx1* e *Pbx2* (*Pbx3* non e' espresso negli arti posteriori; Di Giacomo et al, in press, e *Pbx4* e' espresso solo nei testicoli; Wagner et al. 2001). I risultati ottenuti dimostrano che *Pbx1* non co-localizza con *Shh* ne' in un background wild type, ne' tantomeno in quello *Pbx2*<sup>-/-</sup> (Fig.32C). Tali risultati sono stati validati da esperimenti in cui sezioni adiacenti di arto posteriore wild type al giorno E10 sono state processate per immunohistochimica, al fine di rivelare la distribuzione delle proteine Pbx1/2, ed ibridazione *in situ* (utilizzando una sonda specifica per *Shh*) per evidenziare l'area di espressione di *Shh*. I risultati ottenuti indicano che *Pbx2* e' l'unico membro della famiglia dei Pbx a co-localizzare con *Shh* e quindi responsabile per il legame all'enancher di *Shh* osservato mediante ChIP.

Il significato funzionale del legame osservato e' stato successivamente testato mediante trasfezione transiente di cellule PI9 utilizzando un vettore contenente il gene della luciferasi, a monte del quale e' stato clonato un frammento di 750bp del *ShhE*, e vettori di espressione per Hoxd9, Hoxd10, Hoxd13 e *Pbx2*. Co-trasfezione del vettore reporter per *ShhE* con i vettori di espressione per Hoxd9, Hoxd10 e Hoxd13, risulta in un significativo incremento dell'attivita' basale del reporter. Al contrario trasfettando il vettore reporter e quello di espressione di

Pbx2 non si osserva alcun incremento dell'attività basale del reporter. La co-trasfezione di Pbx2, Hoxd9, Hoxd10 e Hoxd13 non produce un' incremento maggiore rispetto a quello osservato trasfettando solo Hoxd9, Hoxd10 e Hoxd13 (Fig.32D). Tali risultati sono consistenti con quelli che dimostrano la non essenzialità, durante lo sviluppo embrionale, di Pbx2 (Selleri et al. 2004).

#### **4.7 Gli arti *Pbx1*<sup>-/-</sup>;*Pbx2*<sup>+/-</sup> mostrano difetti prossimo-distali parzialmente mediati da alterate interazioni ecto/mesenchimali**

La crescita e la differenziazione prossimo–distale dell'abbozzo degli arti è reso possibile da una serie di interazioni tra l'AER e il mesenchima dell'arto direttamente sottostante ad esso, chiamato "progress zone" o PZ. I fattori chiave necessari per la funzione dell'AER sono i fattori di crescita dei fibroblasti (Fgf). Quattro membri di questa famiglia sono specificamente espressi nell'AER in pattern dinamici complessi durante lo sviluppo degli arti (Niswander L., 2003). Si è anche osservato che le interazioni reciproche tra la ZPA e la AER sono essenziali per un'appropriata crescita dell'arto. In realtà, il segnale Shh dalla ZPA mantiene l'espressione di *Fgf4* nell'AER posteriore e questa a sua volta mantiene l'espressione di *Shh* nella regione ad attività polarizzante (feedback loop *Shh/Fgf4*). È stato dimostrato che *Gremlin*, antagonista delle BMP, regola il segnale Shh dalla ZPA all'AER (Zuniga et al. 1999) in quanto, l'espressione mesenchimale di *Gremlin* è perduta nell'abbozzo degli arti di embrione di topo omozigoti per la mutazione *limbless* (*ld*) nei quali il feedback loop *Shh/Fgf4* non ha luogo. Inoltre, il trapianto di cellule esprimenti *Gremlin* negli abbozzi degli arti *ld*<sup>-/-</sup> ripristina l'espressione di *Fgf4* e quindi il feedback loop *Shh/Fgf4*. L'analisi degli embrioni *Shh*<sup>-/-</sup> rivela che il segnale Shh è necessario per il mantenimento di *Gremlin* e *Formin* (il gene danneggiato dalla mutazione *ld*) mentre l'attivazione dei suddetti geni e di *Fgf4* è indipendente da *Shh*.

Alla luce della perdita dell'espressione di *Shh* negli arti posteriori *Pbx1/2mut* e del ruolo di *Shh* nell'interazione ZPA/AER, abbiamo indagato l'espressione di *Fgf4* nella AER degli arti del mutante. Analisi eseguite ad E10.5 ed E11.5, hanno mostrato che l'inizio dell'espressione di *Fgf4* negli arti dei mutanti è ritardata e

perturbata. Specificamente, ad E10.5, sia gli arti anteriori che quelli posteriori *Pbx1/2mut* sono completamente privi di *Fgf4*. Ad E11.5 gli arti anteriori rivelano un pattern di espressione di *Fgf4* “interrotto”, privo di un trascritto identificabile nella regione intermedia dell’AER. Negli arti posteriori *mut*, invece, *Fgf4* è espresso solo nella parte più posteriore dell’AER (Fig.33). Inoltre, abbiamo analizzato l’espressione negli arti *Pbx1/2mut* di *Gremlin* e delle *BMP* coinvolte nel feedback *Shh/Fgf4* al giorno E10.5. Specificamente, *Gremlin* appare ridotto negli arti anteriori e posteriorizzato in quelli posteriori, confermando che il dominio di espressione *Shh* è, nel migliore dei casi, ridotto (Fig.34). Inoltre, le analisi effettuate ad E10.5 con sonde specifiche per *BMP2* hanno rivelato un pattern relativamente normale di espressione negli arti anteriori, mentre è ridotto in quelli posteriori (Fig.34). Questi risultati, indicano che negli arti *Pbx1/2mut*, il feedback loop *Shh/Fgf4* è perturbato e che l’espressione genica nell’AER di tali mutanti è alterata come la morfologia dell’AER stessa.

#### **4.8 Alterazione precoce nel comportamento delle cellule dorso-ventrali negli arti posteriori *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/-</sup>**

La caratterizzazione DV è coordinata dall’attività di *Engrailed1* (*En1*) nell’ectoderma ventrale dove reprime l’espressione di un altro gene, *Wnt7a*, la cui espressione risulta, quindi, localizzata esclusivamente nell’ectoderma dorsale (Logan et al. 1997; Loomis et al. 1996). Successivamente, *Wnt7a* induce l’espressione del fattore di trascrizione *Lmx1b* nel mesenchima dorsale (Chen et al. 1998; Riddle et al. 1995). Data la precoce mortalità degli embrioni *Pbx1/2mut* (E13.5) e la mancata formazione di un autopodio, non siamo in grado di stabilire, su base morfologica, se esista una possibile alterazione nella caratterizzazione DV. A livello genetico però è stato osservato che la corretta localizzazione/espressione di *En1* e *Wnt7a* nell’ectoderma crea i margini che delimitano l’area di formazione dell’AER senza inficiare sul suo processo di induzione. Data la morfologia abnorme dell’AER degli arti *Pbx1/2mut*, come evidenziato dall’espressione di *Fgf8* (Fig.24) e *BMP2* (Fig.34), abbiamo esaminato il pattern di espressione di *En1* e *Lmx1b* negli arti *Pbx1/2mut*. Ad

E10.5 l'espressione di *En1* appare ridotta negli arti anteriori e perduta in quelli posteriori (Fig.35), mentre l'espressione di *Lmx1b* risulta relativamente invariata in entrambi gli arti (Fig.35). Questi risultati suggeriscono che l'alterazione dell'AER potrebbe essere dovuta ad un'alterazione precoce del comportamento cellulare dorso-ventrale.

## CAPITOLO V

### DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dimostrano che mentre *Pbx1* è necessario per la specificazione della regione prossimale degli arti (Selleri et al .2001), *Pbx1/Pbx2* mostrano funzioni sovrapposte nella caratterizzazione della regione sia prossimale che distale. Tale evidenza è ulteriormente avvalorata dal fenotipo ottenuto negli embrioni doppi mutanti *Pbx1<sup>-/-</sup>;Pbx2<sup>-/-</sup>* in cui si ha la completa assenza di arti sia anteriori che posteriori. Il fenotipo invece caratterizzante gli embrioni *Pbx1<sup>-/-</sup>;Pbx2<sup>+/-</sup>* (*Pbx1/2mut* o *mut*) fornisce un valido modello per studiare i meccanismi alla base dello sviluppo degli arti. Tali embrioni, infatti, mostrano difetti scheletrici sia assiali che appendicolari molto più severi di quelli riscontrati negli embrioni *Pbx1<sup>-/-</sup>* nonché una letalità, precoce (E13.5) rispetto ai *Pbx1<sup>-/-</sup>*, ma più avanzata rispetto ai doppi mutanti omozigoti (E10.5), permettendone quindi uno studio più approfondito.

Il fenotipo scheletrico osservato negli arti anteriori *Pbx1/2mut* risulta essere di entità differente da quello rilevato negli arti posteriori; in questi, infatti, si ha la completa assenza della fibula e delle dita mentre nell'arto anteriore l'ulna e quasi tutte le dita (eccetto il 1 e 5 dito) sono presenti benché malformati. Il diverso fenotipo ottenuto negli arti anteriori verso quelli posteriori potrebbe essere spiegato attraverso la presenza di diversi livelli di espressione di *Pbx1* e *Pbx2*, ma né mediante analisi di ibridazione *in situ* né mediante reazioni di immunoistochimica è stato evidenziato alcuna differenza nei domini di espressione di tali geni durante il normale sviluppo degli arti. La recente scoperta della presenza di *Pbx3* (fino al giorno di gestazione E11.5-12) esclusivamente nell'abbozzo dell'arto anteriore e non di quello posteriore (Di Giacomo et al, in press) suggerisce la probabile esistenza di un meccanismo di compensazione funzionale che potrebbe spiegare il diverso fenotipo ottenuto negli arti di *Pbx1/2mut*. Il mancato ottenimento di alcun fenotipo scheletrico in tutti i genotipi ottenuti da incroci di doppi eterozigoti *Pbx1<sup>+/-</sup>;Pbx2<sup>+/-</sup>* (eccetto *Pbx1<sup>-/-</sup>;Pbx2<sup>-/-</sup>* e

*Pbx1*<sup>-/-</sup>;*Pbx2*<sup>+/-</sup>) evidenzia l'importanza della distribuzione e della temporalità dell'espressione di *Pbx1/2* per lo sviluppo degli arti. In particolare l'area di sovrapposizione delle due espressioni nella regione prossimale degli abbozzi degli arti sembra essere essenziale al fine di un normale sviluppo.

Il fenotipo distale ottenuto negli arti *Pbx1/2mut* mimica quelli osservati sia in embrioni *Shh*<sup>-/-</sup> (Chiang et al, 2001) che in quelli *HoxA*<sup>-/-</sup>;*HoxD*<sup>-/-</sup> (Kmita et al, 2005). La similitudine è particolarmente evidente a livello dell'arto posteriore il cui sviluppo è indotto e procede correttamente fino al giorno di gestazione E10.25-10.5, stadio in cui si ha l'induzione di *Shh*. L'assenza di espressione di *Shh* in tali arti è dimostrata dall'espansione posteriore del dominio di espressione di *Gli3* e dalla riduzione dell'espressione dei geni *Hox* al 5' appartenenti al cluster *D* (Chiang et al. 2001). Recenti studi hanno, infatti, dimostrato l'esistenza di un equilibrio tra i livelli di Gli3R e quelli degli *HoxD* al 5' essenziale al fine di avere un corretto patterning delle dita. Tale equilibrio è regolato da *Shh* a causa della sua influenza sui livelli di Gli3R. Di conseguenza l'assenza della regione autopodiale negli arti *Pbx1/2mut* è da attribuire alla mancata espressione di *Shh* che causa un aumento dei livelli di Gli3R. A livello degli arti anteriori *mut*, invece, la presenza di tre dita indica che l'equilibrio Gli3R/*Hoxd* non è così drasticamente perturbato in quanto, benché ridotta, l'espressione di *Shh* è ancora presente. La residua espressione di *Shh* però non è sufficiente a guidare la specificazione e lo sviluppo del quinto dito che è noto, dalla letteratura, essere l'elemento che necessita, per un corretto sviluppo, di elevate concentrazioni di *Shh* (Harfe et al. 2004). L'assenza del primo dito, invece, è da attribuire a pathway molecolari *Shh*-indipendenti essendo anche l'unico elemento digitale ottenuto negli embrioni *Shh*<sup>-/-</sup> (Chiang et al. 2001).

Alla luce del loop regolatorio tra *dHand/Shh/Hoxd*, in cui *dHand* si posiziona sia a monte che a valle di *Shh* (Zakany et al. 2004), la presenza di *dHand* negli arti *Pbx1/2mut*, al giorno E10.25 (stadio di induzione di *Shh*), suggerisce l'esistenza di un meccanismo di controllo dell'espressione di *Shh* nella ZPA ad opera di *Pbx1/2*, *dHand*-indipendente. La regolazione di *dHand* ad opera di *Shh*, invece,

e' confermata dalla ridotta espressione di *dHand* negli arti posteriori *mut* al giorno E11. I dati mostrati, inoltre, dimostrano che l'espressione di *Pbx1/2* e' necessaria al fine di ottenere un corretto pathway di espressione dei geni *Hoxd* al 5'. Tali geni, noto dalla letteratura essere capaci di variare l'induzione e l'espressione di *Shh*, risultano nell'arto posteriore *Pbx1/2mut*, severamente perturbati, specialmente nel loro dominio di espressione posteriore. Le alterazioni osservate per i geni al 5' *Hoxd* e *Hoxa* non possono essere causate da un'incorretta specificazione del mesenchima nei primi stadi di sviluppo dell'arto *mut* in quanto, analisi di espressione con marker quali *Gli3*, *dHand*, *Alx4* e *Meis2*, dimostrano che tale processo di specificazione avviene correttamente. Tali osservazioni, quindi, suggeriscono un ruolo per *Pbx1/2* nella regolazione, nei primi stadi di sviluppo degli arti posteriori, della distribuzione dell'espressione dei geni *Hox* nel mesenchima. D'altra parte, pero', il fenotipo ottenuto nell'arto anteriore *mut* suggerisce che, a livello degli arti anteriori, il meccanismo di regolazione di *Shh* da parte degli *Hox* e' solo in parte dipendente da *Pbx1/2*, in quanto sia gli *Hoxd* che *Shh* sono ridotti, ma non persi.

Analisi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) su abbozzi di arti anteriori e posteriori di topo al giorno E10.5, usando antisieri specifici contro *Hoxd10*, *d13* e *Pbx* dimostrano che sia gli *Hox* che i *Pbx* sono effettivamente capaci di legare una sequenza locata 1Mb dal promotore di *Shh* (*ShhE*), evolutivamente conservata e capace di dirigere la corretta espressione spazio-temporale di *Shh* negli arti del topo. Analisi di co-localizzazione dei trascritti e delle proteine dei *Pbx* dimostrano che *Pbx2* e' l'unico possibile membro della famiglia dei *Pbx* capace di co-localizzare con *Shh* e quindi responsabile per il legame all'enhancer di *Shh* osservato mediante ChIP. Benché *Pbx2* non sia capace di attivare la trascrizione, come dimostrato mediante reporter assay in cellule P19, il suo legame all'enhancer di *Shh* potrebbe avere la funzione di "segnale" per il reclutamento di altri fattori trascrizionali, come dimostrato nel caso del legame al promotore di *myogenin* da parte di *Pbx1* (Berkes et al, 2004). I nostri risultati circa la necessita' della presenza di piu' proteine *Hox* nel processo di induzione di *Shh*, sono consistenti, non solo con i dati riportati in letteratura che dimostrano

come la mutazione di singoli geni *Hox* non producano fenotipi, ma anche con il fenotipo caratterizzante gli embrioni *HoxA*<sup>-/-</sup>;*HoxD*<sup>-/-</sup> (Capecchi 1997; Kmita et al 2005). Rispetto a quest'ultimi il fenotipo degli arti posteriori *Pbx1/2mut* risulta essere, però, molto più severo suggerendo la possibilità che il meccanismo *Hoxd/Shh* alla base del corretto sviluppo degli arti non sia l'unico processo ad essere alterato in assenza di *Pbx1/2*. Il ruolo dei *Pbx* nello sviluppo degli arti, potrebbe ricalcare quello nello sviluppo della milza, in cui si è osservato che *Pbx1* controlla gerarchicamente tutti i meccanismi richiesti per lo sviluppo di tale organo (Brendolan et al. 2005).

Dal punto di vista evoluzionistico, i risultati ottenuti indicano che i meccanismi che conducono alla caratterizzazione prossimo-distale degli arti si sono scarsamente conservati dagli insetti ai vertebrati. Diversamente dai vertebrati, infatti, lo sviluppo lungo l'asse prossimo-distale degli arti del moscerino della frutta, avviene indipendentemente dagli *Hox*. Mentre, in *Drosophila*, *Exd* (ortologo di *Pbx1*) è necessario per la specificazione della sola identità prossimale degli arti, nei vertebrati, *Pbx1* non solo specifica la regione prossimale (Selleri et al. 2001) ma anche quella distale. Parte di questa innovazione dei vertebrati, può risiedere nella localizzazione di *Pbx2* nella parte distale dell'arto e nel suo ruolo, attraverso la sua interazione con *Pbx1*, di regolatore dell'espressione spaziale degli *Hox* nel mesenchima degli arti posteriori in sviluppo.



## CAPITOLO VI

### MATERIALI E METODI

#### 6.1 Incroci

Al fine di ottenere topi doppi eterozigoti  $Pbx1^{+/-};Pbx2^{+/-}$ , sono stati effettuati incroci tra topi  $Pbx1^{+/-}$  e  $Pbx2^{+/-}$ . E' stato osservato che utilizzando come background genetico il C57BL/6 il numero di doppi eterozigoti ottenuti era minore alle attese. Al fine di aumentare il numero di tali topi, i maschi doppi eterozigoti sono stati portati su di un background blackswiss comportando un minimo. La progenie ottenuta da incroci tra maschi doppi eterozigoti a background misto e femmine doppie eterozigoti C57BL/6 pure e' stata successivamente analizzata, sia dal punto di vista morfologico che scheletrico, per rilevare eventuale miglioramento nel fenotipo ottenuto da parte del background blackswiss. Nessun drastico miglioramento e' stato rilevato. Gli embrioni ottenuti da incroci di topi doppi eterozigoti  $Pbx1^{+/-};Pbx2^{+/-}$  sono stati dissezionati a giorni di gestazione differenti (E9-E14.5). Il mattino successivo agli incroci, le femmine che mostravano la presenza del tappo vaginale sono state considerate essere ad un giorno di gestazione pari a E0.5. Gli embrioni sono stati dissezionati in PBS, fissati in 4% paraformaldeide overnight, disidratati attraverso la serie di metanoli/PBS (25%, 50%, 75%, 100%) e conservati a -20C.

#### 6.2 Purificazione di DNA genomico

Un piccolo pezzo della coda e' stato tagliato e digerito in 750µl di buffer di lisi (50mM Tris-HCl pH8, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 0.5 mg/ml Proteinase K) ed incubato a 54C overnight. Successivamente il DNA e' stato sottoposto a diverse purificazioni fenolo-cloroformio al fine di eliminare la componente proteica e precipitato con etanolo. Il giorno dopo il pellet ottenuto in seguito a centrifugazione, e' stato sciacquato in etanolo al 70%, asciugato e risospeso in 100µl di TE.

### 6.3 PCR

Le reazioni di PCR (Polymerase Chain Reaction) sono state effettuate mediante l'utilizzo della Taq polimerasi e dei buffer Boeringher Mannheim. La mix di reazione utilizzata e' composta da: 1X buffer di reazione, 1mM primer, 0.2 mM dNTP's e 0.5 µl Taq polimerasi in un volume finale di 25µl. Le reazioni di PCR sono state effettuate utilizzando i seguenti parametri: una iniziale denaturazione di 5min a 95C seguita da 30 cicli di denaturazione (30sec a 95C), annealing (30sec a 57C) ed elongation (2min a 72C).

### 6.4 Isolamento dei plasmidi

Batteri E.coli sono stati elettroporati con plasmidi contenenti la sequenza di cDNA di interesse e piastrati. Successivamente una colonia e' stata piccata e fatta crescere in 250ml di LB a 37C overnight ed i plasmidi sono stati purificati il giorno dopo attraverso l'utilizzo di colonne per maxi-prep della Qiagen. La concentrazione del DNA ottenuto e' stata verificata attraverso lettura allo spettrofotometro a 260nm.

### 6.5 Ibridazione *in situ*

L'ibridazione *in situ* e' stata effettuata utilizzando sonde ad RNA (senso ed antisenso) specifiche per cDNA di diversi geni. Tali sonde sono state ottenute mediante trascrizione in vitro utilizzando le RNA polimerasi T3 o T7 e marcate con Digoxigenina (Roche). Gli embrioni da processare per ibridazione *in situ* sono stati reidratati, chiarificati in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 1h e trattati con proteinasi K 10µg/ml per un tempo diverso a secondo del giorno di gestazione (E9.5: 5min; E10.5: 10min; E11.5: 15min). Successivamente gli embrioni sono stati messi in soluzione di ibridazione (50% Formamide, 5xSSC, 50µg/ml yeast RNA, 1%SDS, 50µg/ml heparin, 0.1% CHAPS) per almeno 2h a 70C ed, infine, sono stati lasciati ad incubare, overnight a 70C, nel buffer di ibridazione contenente 1µg/ml di sonda. Il giorno dopo, gli embrioni sono stati lavati in serie decrescenti di soluzioni SSC (5xSSC, 2xSSC, 3 volte 30min ogni sciacquo; 0.2xSSC e

0.1xSSC una volta ciascuno per 30min) a 70C, lavati in TBST (Tris buffered saline/0.1% Tween), incubati per 1h con il buffer di blocking 10% ed incubati overnight con anticorpo anti-digoxigenina coniugato con alkan fosfatasi (AP; 1:5000 in TBST). Dopo molteplici lavaggi in TBST la reazione colorimetrica e' stata sviluppata in NTMT (100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH9.5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween20) contenente NBT/BCIP (20µl/ml in NTMT). Una volta raggiunto il grado di colorazione desiderato, la reazione e' stata bloccata con lavaggi in PBS e gli embrioni fissati in 4%PFA e fotografati.

## **6.6 Immunoistochimica**

Per le reazioni di immunoistochimica, gli embrioni sono stati dissezionati in PBS, fissati in 4% paraformaldehyde overnight, disidratati in sucrosio 30% e inclusi in OCT(Tissue-Tec). Sezioni trasversali dello spessore di 10µm sono state fissate in acetone freddo per 10min e successivamente trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>0.1% al fine di bloccare le perossidasi endogene. Le sezioni sono state successivamente incubate in PBS /0.1% Triton100 / 10% siero di capra per 1h a temperatura ambiente e poi incubate, overnight, con anticorpo primario Rabbit anti-Pbx1 o anti-Pbx2 (Pbx1 (P-20) sc-889; Pbx2 (G-20) sc-890 [Santa Cruz]) diluito 1:200 in PBS/0.1%Triton100 a 4C. Successivamente le sezioni sono state lavate in PBS/0.1%Triton100 ed incubate con anticorpo secondario Biotin-SP-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (Jackson Immuno Research) diluito 1:500 in PBS. Il segnale e' stato rilevato mediante DAB (3,3 diaminobenzidina) e le sezioni successivamente sono state disidratate in serie di alcool crescenti, lavate in Xilolo e chiuse con copri oggetto.

## **6.7 Colorazione Alcian Blue – Alzarin Red**

Embrioni al giorno di gestazione E12.5 e E13.5 sono stati dissezionati e disidratati in alcool95% per 2h. Dopo la rimozione di pelle e viscere, gli embrioni sono stati lasciati disidratare per 5 giorni in alcool 95% e successivamente posti in acetone per 2 giorni al fine di rimuovere tutta la componente lipidica embrionale. I componenti cartilaginei ed ossei degli embrioni sono stati colorati a

mezzo di di una soluzione contenente: 0.015% Alcian Blue, 0.005% Alizarin Red, 5% acido acetico glaciale in 70% alcool (3 giorni a temperatura ambiente). Successivamente gli embrioni sono stati lavati in ddH<sub>2</sub>O, chiarificati in 1%KOH per 2 giorni e conservati in glicerolo.

### **6.8 Chromatin Immunoprecipitations (ChIP)**

Arti di topo sono stati dissezionati al giorno di gestazione E10.5 e raccolti in terreno essenziale minimo Alpha (Minimum Essential Medium Alpha). Per disaggregare i tessuti i campioni sono stati fatti passare ripetutamente attraverso aghi da siringa, 18G e 20G, e poi fissate per 15 minuti a temperatura ambiente con una soluzione 1% formaldeide. La reazione è stata bloccata aggiungendo una soluzione 0,125M di glicina in PBS per 5 minuti. Le cellule sono state poi sonicate con 15 impulsi di 25 secondi di durata ciascuno in modo da ottenere dei frammenti di DNA di lunghezza media compresa tra i 500-1000 bp. La cromatina è stata incubata con 20 µl di protein G-Agarose per due ore, in modo da eliminare possibili interazioni aspecifiche con le biglie, e successivamente incubata con 5 µg dei rispettivi antisieri specifici, o con 5 µg di anticorpo anti-Flag (F3165, Sigma) usato come controllo, overnight a 4°C. Gli anticorpi sono stati immunoprecipitati con 10 µl di proteina G-Agarosio (KPL) che era stata precedentemente saturata con una soluzione contenente 1 µg/ml di sperma di salmone e 1 µg/ml di albumina di siero bovino (BSA).

I seguenti oligo sono stati usati per amplificare per PCR specifiche sequenze:

mShhE1, 5'-CTTTGATTTGAAGTCCTGGC-3';

mShhE2, 5'-ACTGAGGGGAAAAGTCATC-3';

mShhC1, 5'-TCAAGAGAGATCAACAAAAG-3';

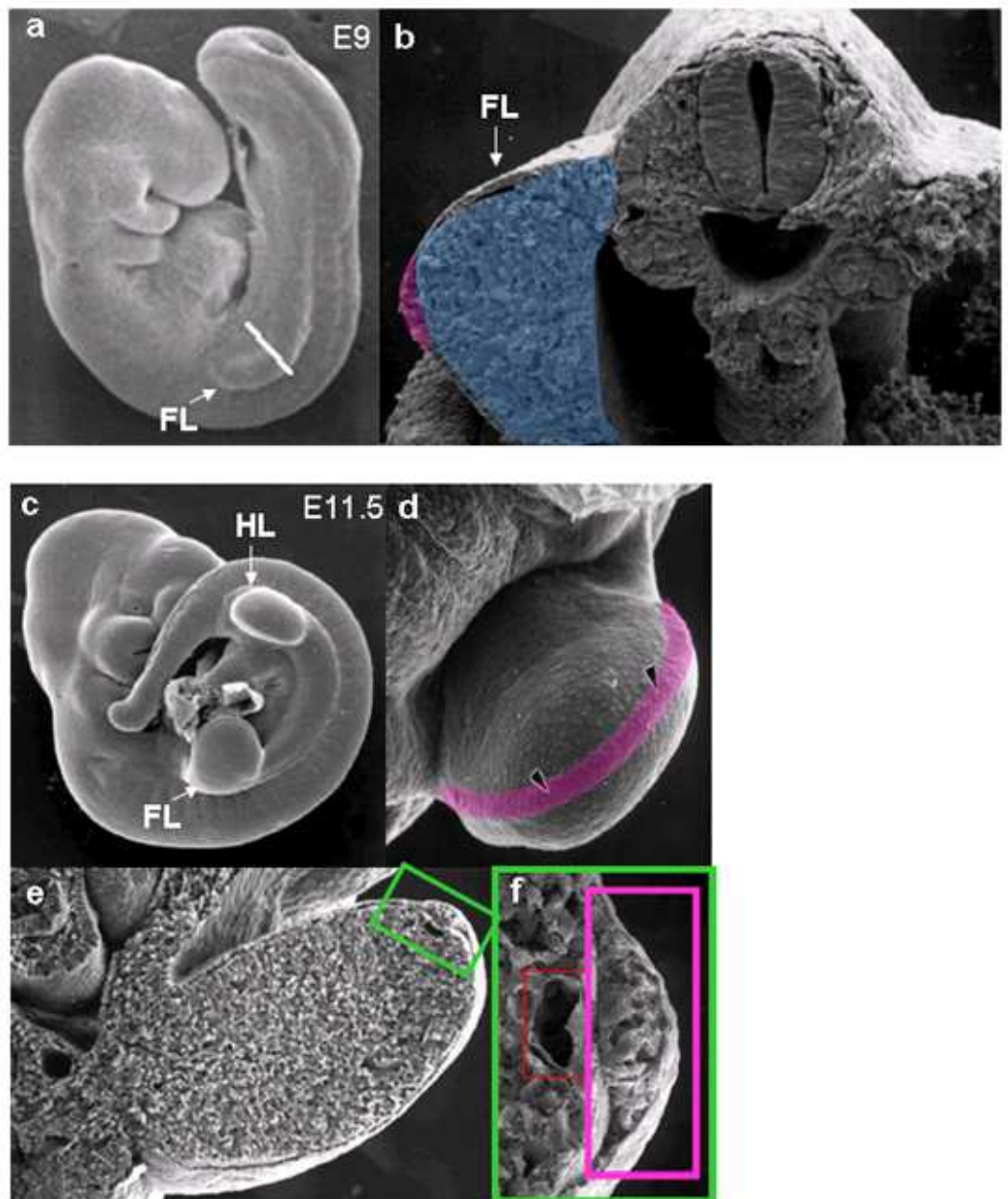
mShhC2, 5'-TTGGACTCAAGTCCAGAC-3'.

### **6.9 Colture cellulari e trasfezioni**

Cellule di carcinoma di embrione di topo (P19) sono state tenute in coltura in Terreno Essenziale Minimo Alpha (Minimum Essential Medium Alpha) a cui è stato aggiunto siero fetale di vitello (fetal calf serum) ad una concentrazione finale

del 10%, 2 mM L-glutamina, 100U/ml penicillina, e 100µg/ml streptomicina. Le trasfezioni sono state eseguite utilizzando la tecnica della precipitazione del  $\text{CaPO}_4$ . In un tipico esperimento sono stati utilizzati, per una piastra di 6 cm, 5 µg del plasmide reporter, 2.5-5.0 µg di un costrutto di espressione e 0.1 µg di CMV-µgal (Clontech) come controllo. 48 ore dopo la trasfezione le cellule sono state raccolte, lavate, lisate e analizzate per l'espressione della luciferasi e della  $\beta$  galattosidasi, come precedentemente descritto da (Zappavigna et al.;1994).

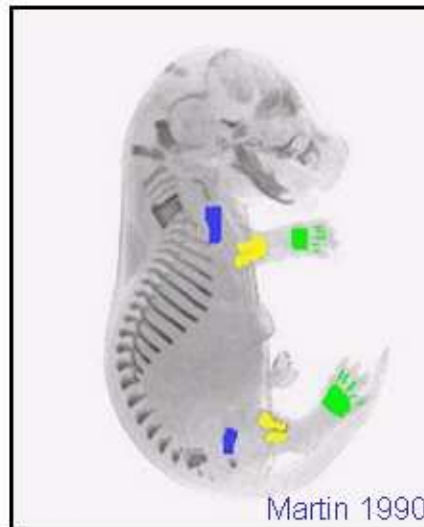
**CAPITOLO VIII**  
**FIGURE**



Martin 1990

**Fig.1 Analisi al SEM di embrioni di topo**

**a)** Embrione di topo al giorno di gestazione E9. A tale stadio di sviluppo si inizia a rendere visibile l'abbozzo dell'arto anteriore (FL) **b)** Sezione trasversale dell'abbozzo dell'arto anteriore al giorno E9. Area blue: mesenchima; Area rosa: ectoderma **c)** Embrione al giorno di gestazione E11.5. FL: abbozzo arto anteriore; HL: abbozzo arto posteriore **d)** Visione dorso-ventrale di abbozzo di arto anteriore al giorno E11.5. Area rosa: cresta apicale ectodermica (AER) **e)** Sezione trasversale di arto anteriore al giorno E11.5 **f)** AER ad un maggiore ingrandimento. Rettangolo rosa: indica l'AER; Rettangolo rosso: indica un vaso sanguigno



**Fig.2 Elementi degli arti**

•Stilopodio:

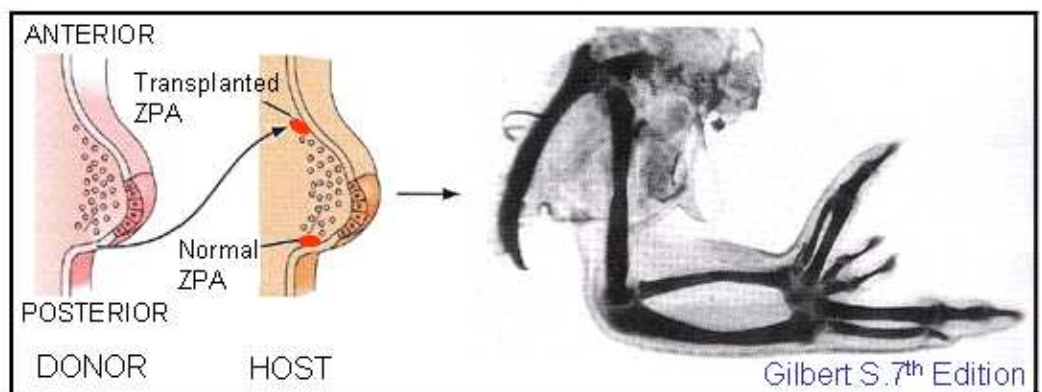
- Omero nell'arto anteriore
- Femore nell'arto posteriore

•Zugopodio:

- Radio ed ulna nell'arto anteriore
- Tibia & Fibula nell'arto posteriore

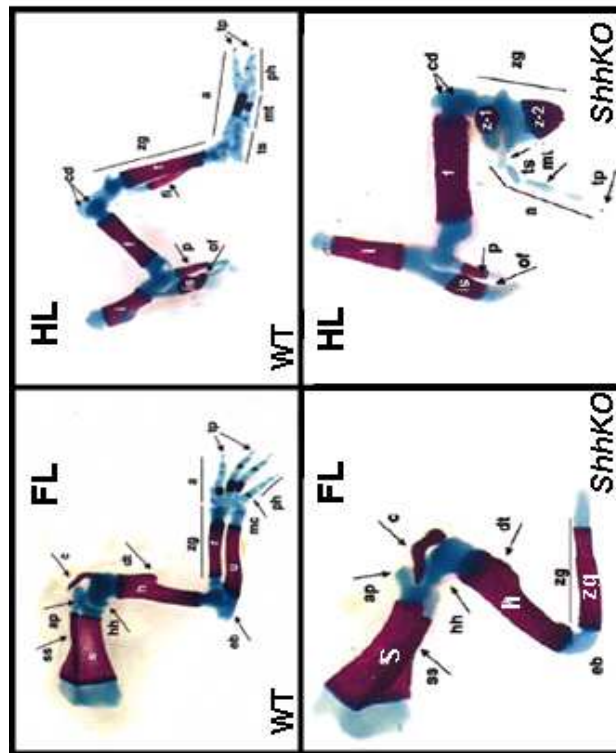
•Autopodio

- Carpo, metacarpi e falangi nell'arto anteriore
- Tarso, metatarsi e falangi nell'arto posteriore



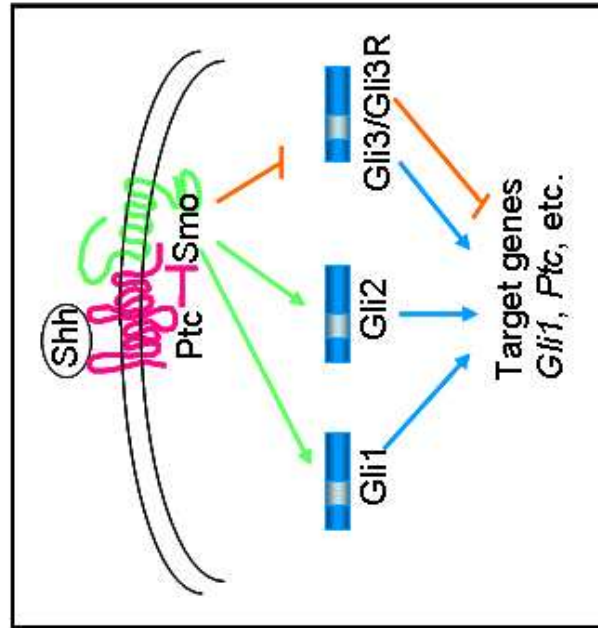
**Fig.3** Il trapianto della ZPA in un mesoderma di arto ospite conduce alla duplicazione speculare delle falangi



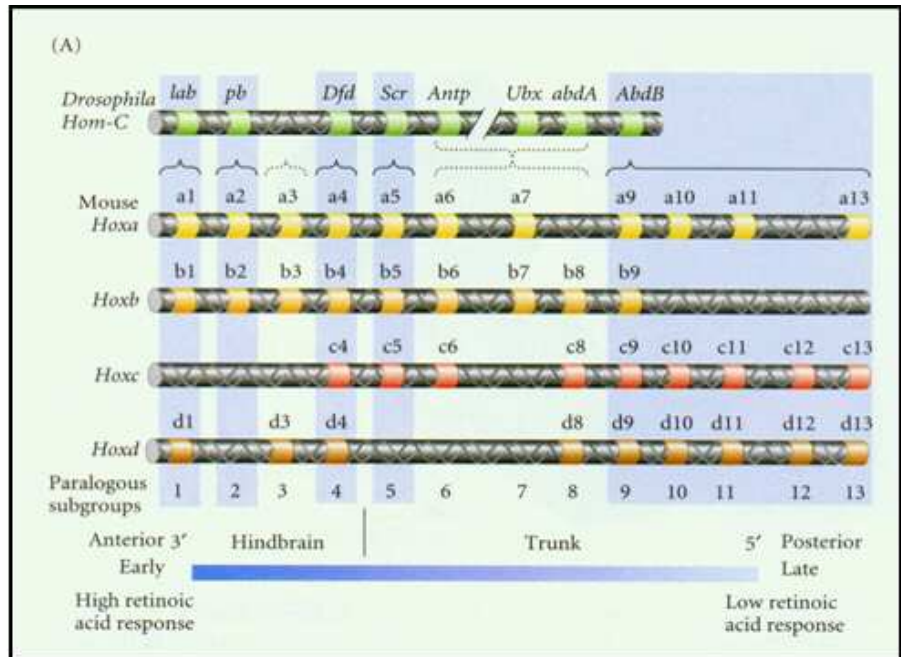


Chiang et al; 2001, *Dev. Biol.*

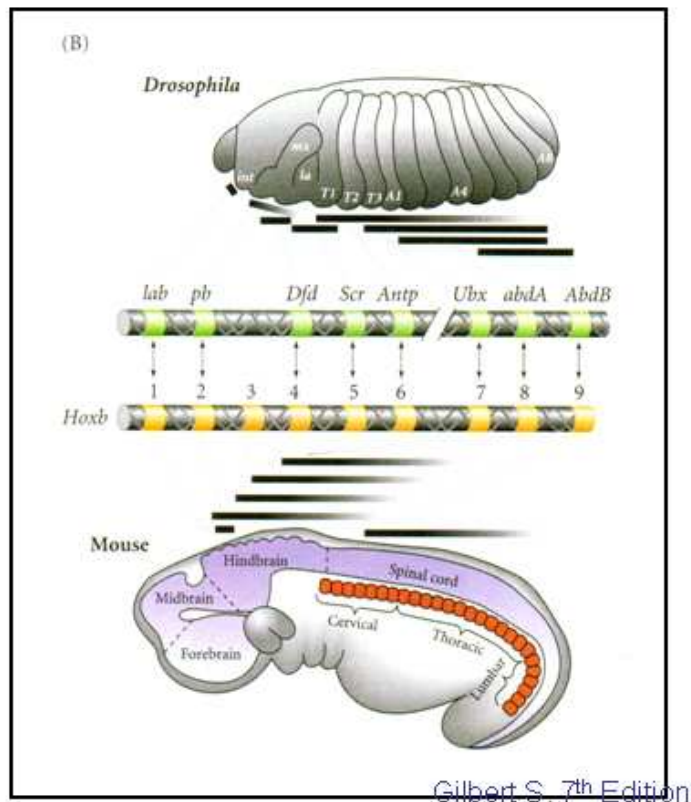
**Fig.4 Preparazioni scheletriche di embrioni *ShhKO* e WT al giorno E17.5** L'arto anteriore (FL) *ShhKO* è caratterizzato da una scapola (S) ed un omero (h) morfologicamente normali. A livello del gomito (eb), però, l'omero risulta connesso ad un unico elemento zugopodiale (zg). Come l'arto anteriore, anche quello posteriore (HL) è caratterizzato da una parte prossimale (cintura pelvica e femore) il cui sviluppo procede normalmente, mentre la morfologia dello zugopodio risulta severamente compromessa (zg). Inoltre, l'autopodio, consta di un unico raggio digitale che emerge dai due elementi zugopodiali.



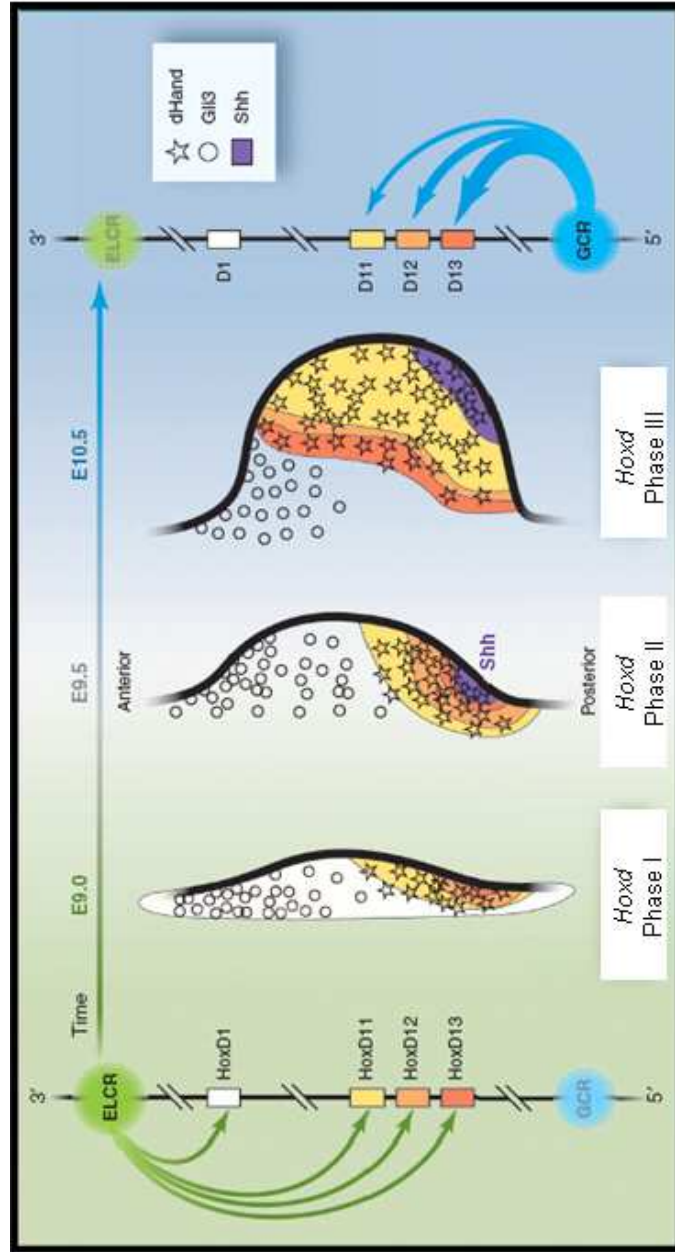
**Fig.5 Meccanismo di trasduzione del segnale di Shh** In assenza di Shh, il recettore di Shh, Patched (Ptc), reprime Smoothened (Smo) provocando il taglio proteolitico di Gli3 nella sua forma di repressore (Gli3R). Il legame di Shh a Ptc, invece, permette a Smo di inibire il processo proteolitico a carico di Gli3 che viene così accumulato nella sua forma di attivatore



**Fig.6** Gli ortologi nei vertebrati dei geni *HomC* di *Drosophila* sono i geni *Hox*. Essi sono organizzati in quattro cluster (*a*, *b*, *c*, *d*) locati su quattro cromosomi diversi



**Fig.7** Comparazione tra i pattern dei trascritti dei geni *HomC* in *Drosophila* e quelli di *Hoxb* in topo



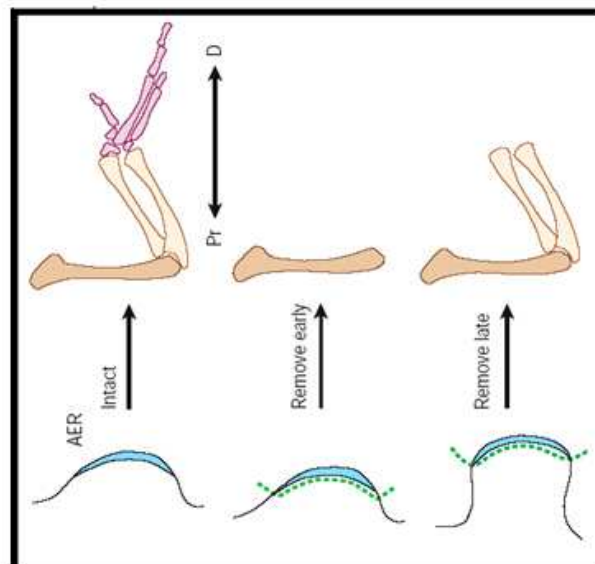
Dechamps J. 2004, *Science*

**Fig.8 Pattern di espressione dei geni al 5' Hoxd**

Fase I: corrisponde al patterning dello stilopodio ed è caratterizzato dall'espressione in tutto l'arto di Hoxd9 e Hoxd10. Fase II: ha inizio con l'induzione dell'espressione di *Shh* nella ZPA ed è caratterizzato dalla sovrapposizione antero-posteriore dei geni *Hoxd9*, *d10*, *d11*, *d12*, *d13*. A questo stadio *Hoxd13*, quindi, risulta essere il gene espresso più vicino alla ZPA. Il mesenchima esibente la suddetta espressione genica darà origine agli elementi dello zugopodio. Fase III: è caratterizzata dalla completa inversione (colinearità inversa) della distribuzione antero-posteriore dei trascritti degli *Hoxd* tale che, il gene *Hoxd9* risulta, adesso, quello la cui espressione è strettamente localizzata nella porzione posteriore dell'abbozzo dell'arto.

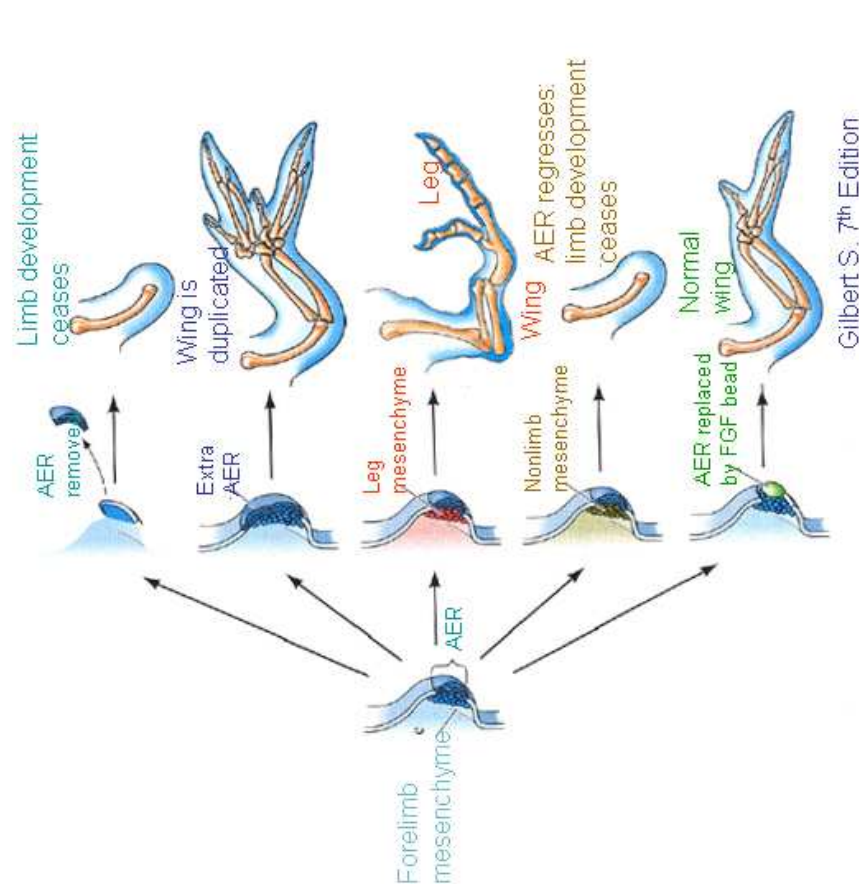
La regione di controllo iniziale dell'arto (ELCR) situata sull'estremo 3' del cluster *HoxD* guida la regolazione (colineare) progressivamente più posteriore dei geni *Hoxd*, mentre la colinearità inversa è, probabilmente, mediata da un enhancer a sede centromerica nel cluster denominato "regione globale centrale" (GCR)





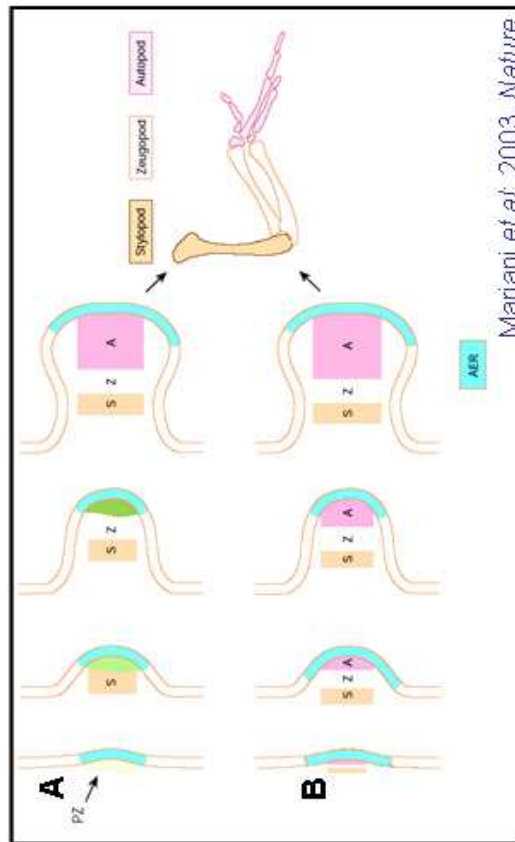
Mariani *et al.*, 2003, *Nature*

**Fig.9** La rimozione dell'AER ad ogni stadio dello sviluppo, determina un arresto della crescita dell'arto. Quando l'AER viene escissa ad uno stadio più avanzato di sviluppo, e quindi quando molti elementi dell'arto sono già formati, la crescita dell'arto cessa con troncamento ai livelli più distali, mentre quando l'escissione viene effettuata a stadi più precoci, lo sviluppo dell'arto cessa con troncamento a livelli più prossimali

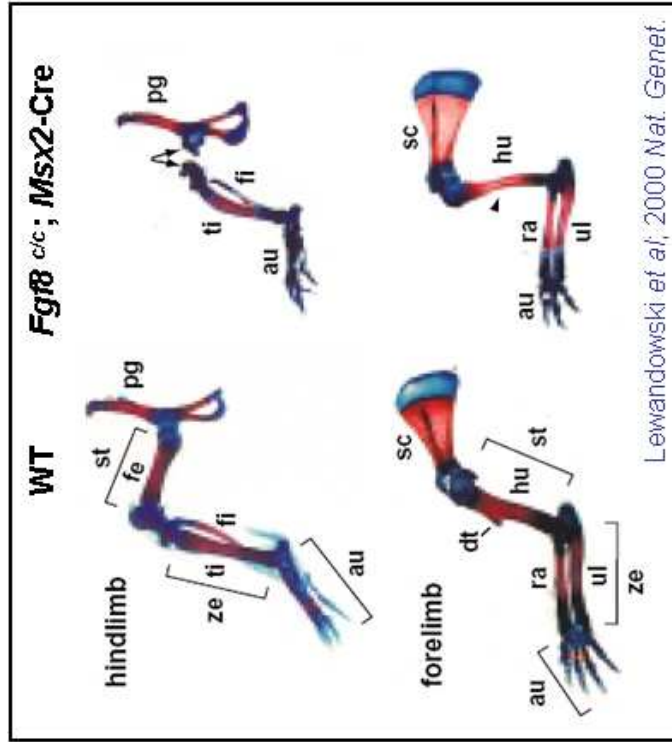


Gilbert S. 7th Edition

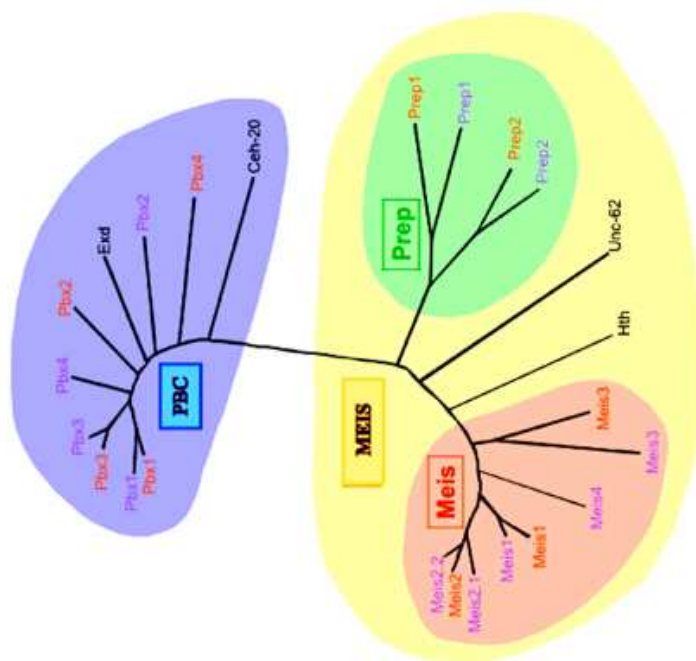
**Fig.10 Esperimenti che dimostrano l'influenza dell'AER sul mesenchima sottostante.** Il trapianto di una seconda AER vicina all'originale conduce alla formazione di un arto soprannumerario e la sostituzione del mesoderma alare con il mesoderma di una zampa sotto l'AER alare, determina lo sviluppo di una zampa. Se mesoderma non di arto è trapiantato al disotto della AER, esso regredisce e lo sviluppo dell'arto cessa



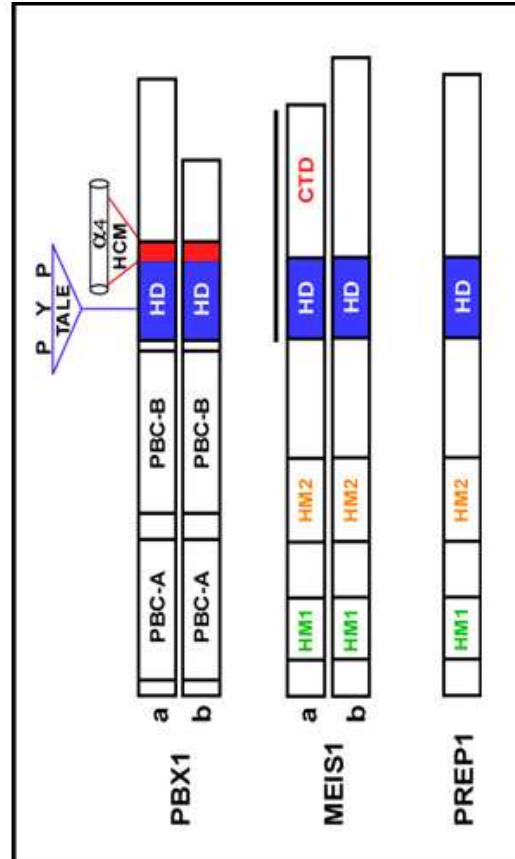
**Fig.11 Modelli di sviluppo degli arti lungo l'asse prossimo-distali.** A. Secondo l'ipotesi della progress zone, l'AER produce e rilascia sostanze (ora note essere Fgf) che diffondono per una distanza di circa 300  $\mu$ m. Questa distanza prossimale all'AER si ritiene costituisca la progress zone (PZ). Le cellule di questa zona, sotto l'influenza di questi fattori, acquisiscono caratteri distali: proliferando, le cellule abbandonano la progress zone e, libere dall'influenza di questi fattori, iniziano a differenziare secondo l'informazione posizionale, formando strutture prossimali e distali: prima omero/femore, poi radio/tibia e ulna/perone, metacarpi e infine dita. B. Secondo il modello della specificazione precoce proposto da Dudley, le cellule che contribuiscono alla formazione dei segmenti prossimo-distali (S: stilopodio, Z: zugopodio, A: autopodio) si trovano in domini stratificati all'interno dell'abbozzo degli arti iniziali.



**Fig.12 Preparazione scheletriche di arti *Fgf8*<sup>c/c</sup>; *Msx2-Cre*.** Gli arti posteriori (hindlimb) di tali mutanti mostrano la presenza di un elemento (freccia di sx), simile alla regione condilare del femore e fusa alla tibia (ti). La testa del femore risulta fusa alla cintura pelvica (pg). Gli arti anteriori (forelimb) *Fgf8*<sup>c/c</sup>; *Msx2-Cre* sono, invece, caratterizzati dall'assenza (freccia) della tuberosità deltoidea (dt).

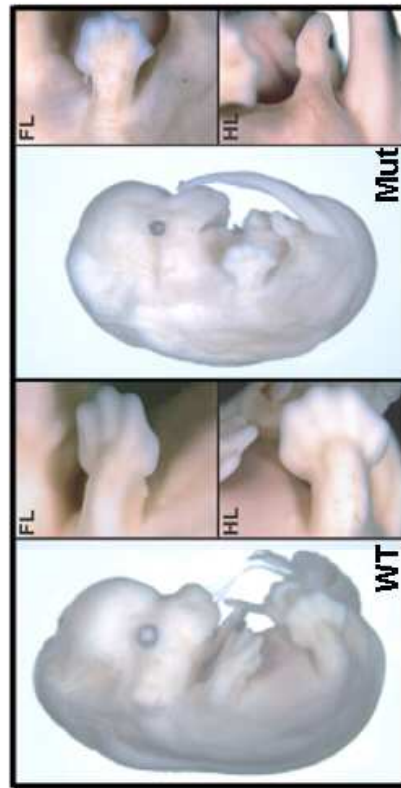


**Fig.13 Filogenia dei cofattori Hox.** Le proteine con omeodominio appartenenti alla classe TALE sono divise in due gruppi: la famiglia dei PBC che include Exd (*Drosophila*), Ceh20 (nematodi) e i Pbx (vertebrati); e la famiglia MEIS che include Hth (*Drosophila*), Unc62 (nematodi) e le famiglie di Meis e Prep (vertebrati). Le proteine di topo sono riportate in arancio mentre gli ortologhi in zebrafish in viola.

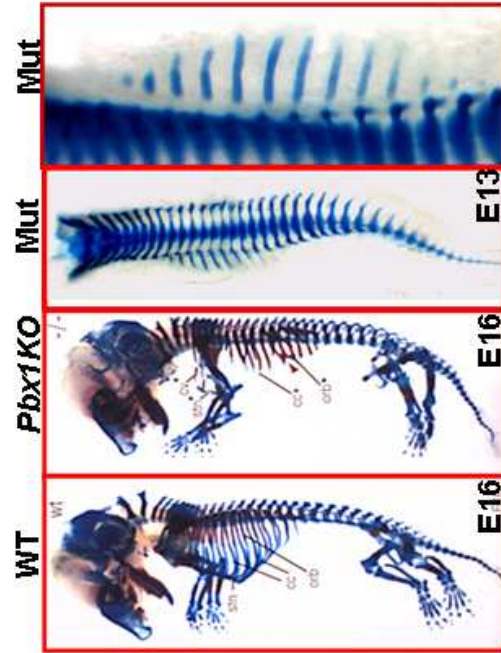


**Fig.14 Struttura delle proteine TALE.** Le proteine appartenenti alla classe TALE sono caratterizzate da un omeodominio divergente a causa della presenza di tre aminoacidi addizionali (prolina-tirosina-prolina) che formano un loop tra la I e la II elica. Al C-terminale dell'omeodominio, le proteine Pbx presentano un ulteriore dominio (HCM) di legame al DNA. I domini PBC-A e PBC-B sono, invece, altamente conservati, e sono implicati nell'interazione con le proteine Meis/Prep. Come i PBC-A,B, anche i domini HM1 e HM2 delle proteine Meis/Prep sono altamente conservati e mediano l'interazione con i Pbx. Le proteine Meis esibiscono inoltre, la presenza di un dominio al C-terminale (CTD) capace di interagire direttamente con le proteine Hox della classe AbdB.

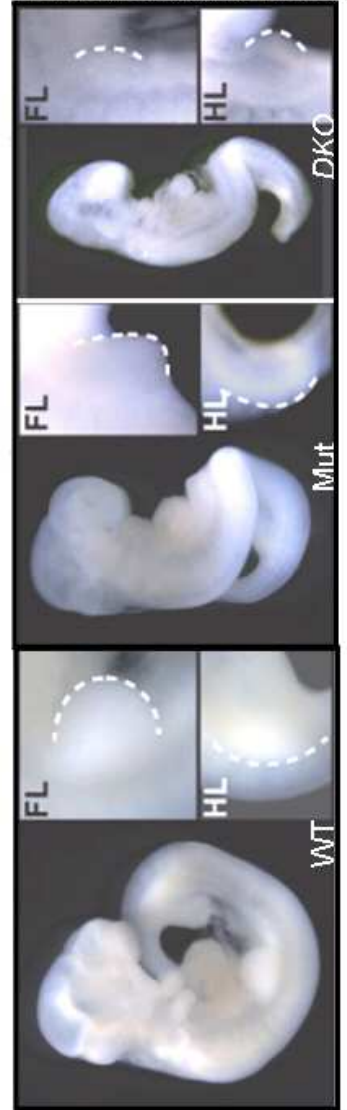




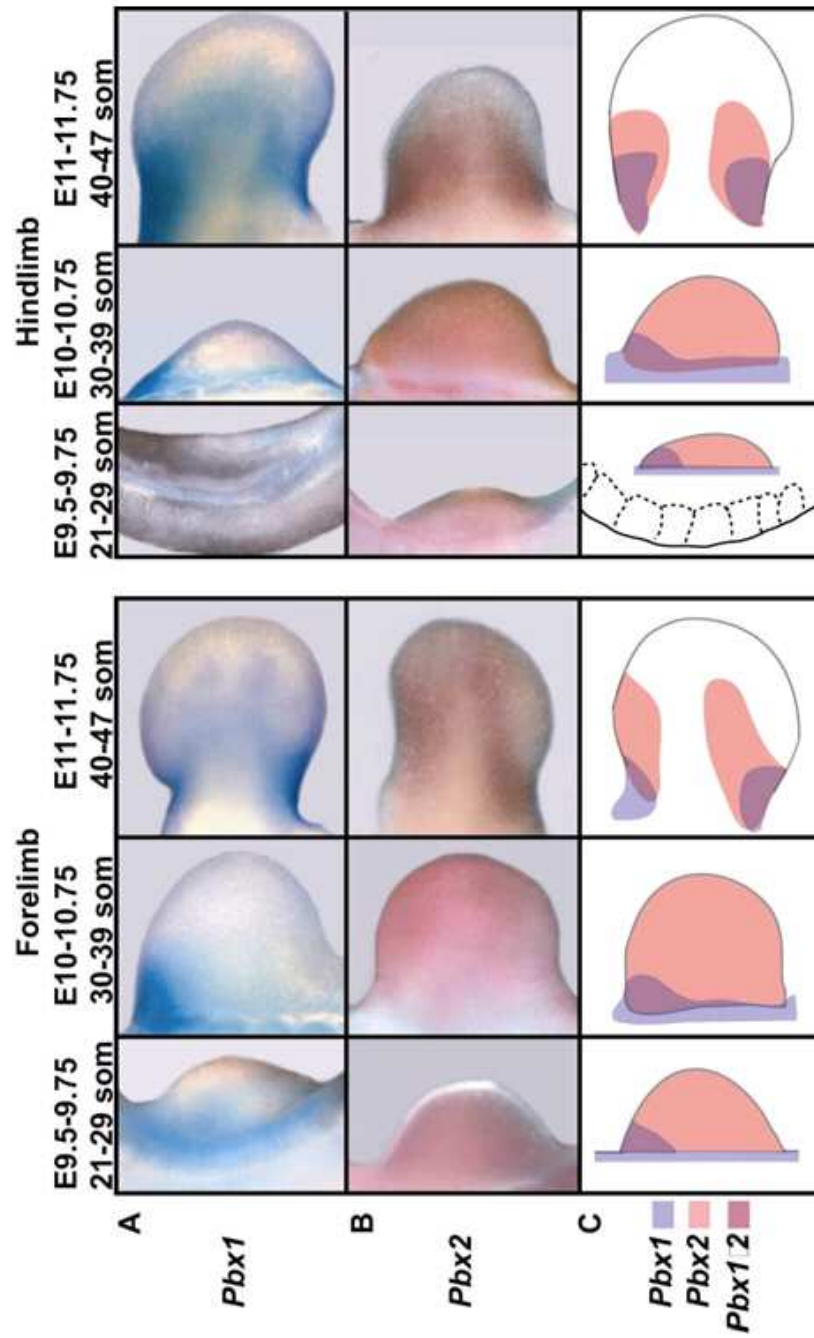
**Fig.15 Morfologia di embrioni *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/-</sup> (Mut) al giorno E13.5.** Gli embrioni Mut esibiscono un fenotipo appendicolare diversificato. Mentre l'arto anteriore (FL) presenta uno zügopodio più corto rispetto a quello osservato in embrioni WT, l'arto posteriore (HL) è caratterizzato da uno zügopodio disomorfico e dalla completa assenza di elementi autopodiali



**Fig.16 Preparazioni scheletriche di embrioni *Pbx1*<sup>-/-</sup> e *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/-</sup> (Mut).** Gli embrioni Mut esibiscono un fenotipo assiale molto più severo di quello osservato nei *Pbx1*<sup>-/-</sup>. Mentre in questi ultimi le costole sono ipoplastiche e fuse tra di loro, negli embrioni Mut si osserva sia la completa assenza di costole o, se presenti, queste mancano della porzione ventrale

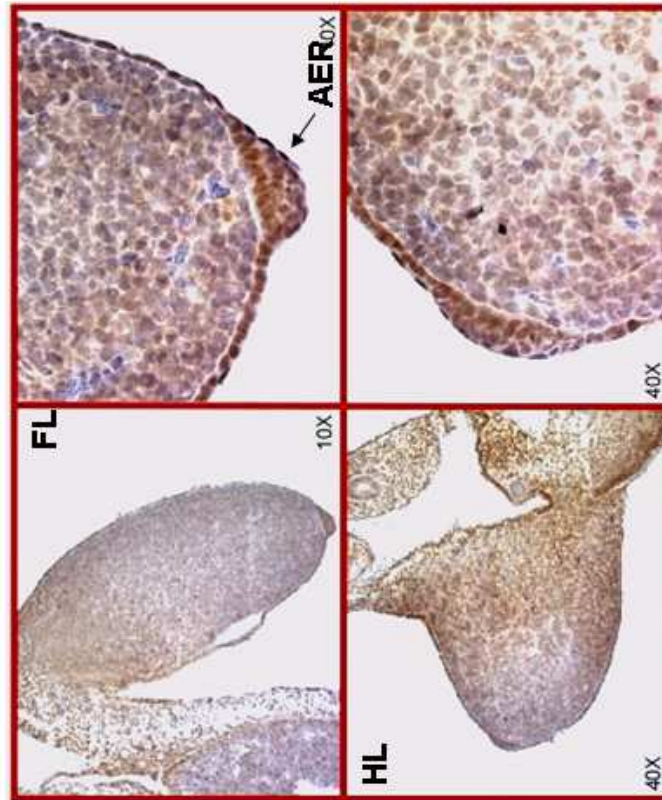


**Fig.17 Morfologia di embrioni *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/-</sup> (Mut) al giorno 10.5.** Rispetto all'arto anteriore (FL) WT, quello Mut risulta essere prossimo-distalmente più corto e disomorfico a livello anteriore-posteriore. Al contrario, l'arto posteriore (HL) Mut esibisce uno sviluppo morfologico comparabile a quello WT. Embrioni *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>-/-</sup> (DKO) sono caratterizzati dalla completa assenza di arti sia anteriori che posteriori

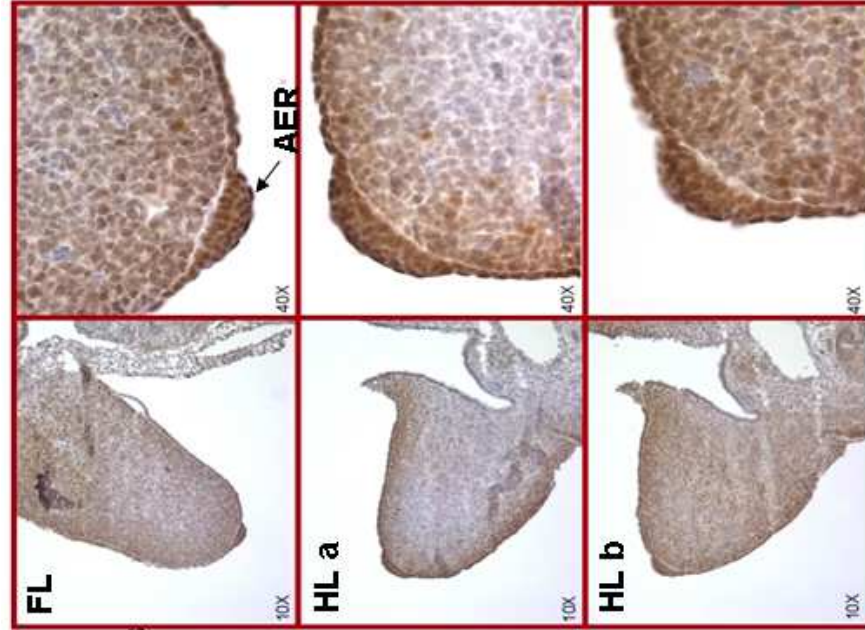


**Fig.19 a-b Espressione di *Pbx1* e *Pbx2* durante lo sviluppo degli arti. a-b** Al giorno di gestazione E9.5-10.5 *Pbx1* e *Pbx2* è espresso nella regione prossimale e anteriore dell'arto, mentre *Pbx2* risulta essere espresso in tutto l'abbozzo degli arti. Al giorno E11-11.5 *Pbx1* e' sempre presente nella parte prossimale degli arti, ma localizzato in due domini, uno anteriore ed uno posteriore all'autopodio. Allo stesso modo, *Pbx2* diventa localizzato, nei suddetti domini, anche se in modo piu' diffuso. **c** Diagramma che evidenzia l'espressione dinamica di *Pbx1* (lilla) e *Pbx2* (rosa) e le aree ad espressione sovrapposta (viola). Som: somiti FL: arto anteriore HL: arto posteriore

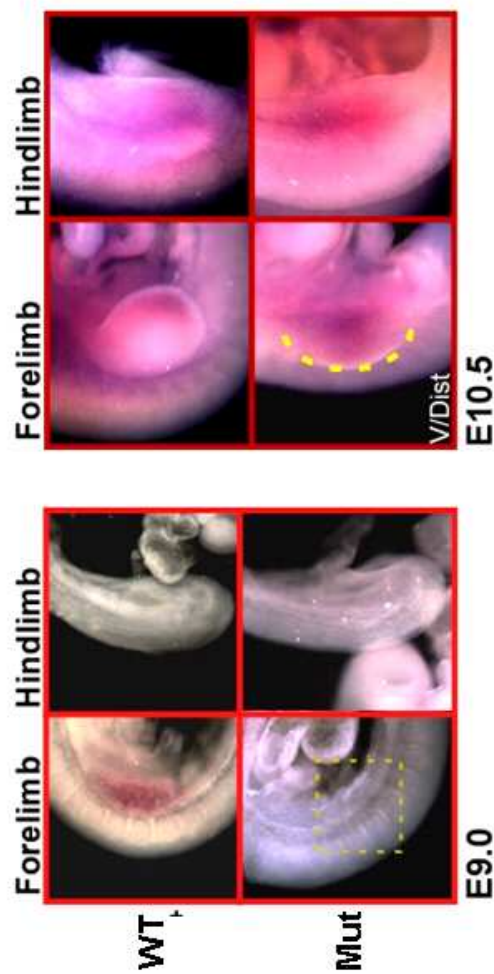




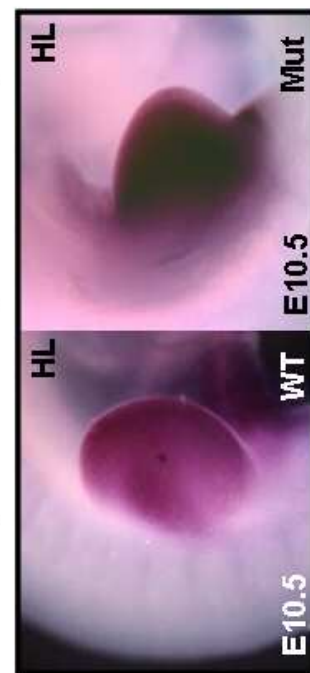
**Fig.20 Localizzazione di Pbx1 negli arti anteriori e posteriori al giorno E10.5.** Reazioni di immunohistochimica, effettuate con anticorpo specifico per Pbx1, evidenziano la localizzazione di tale proteina nella regione prossimale e nella cresta ectodermica apicale (AER) di arti sia anteriori (FL) che posteriori (HL) WT.



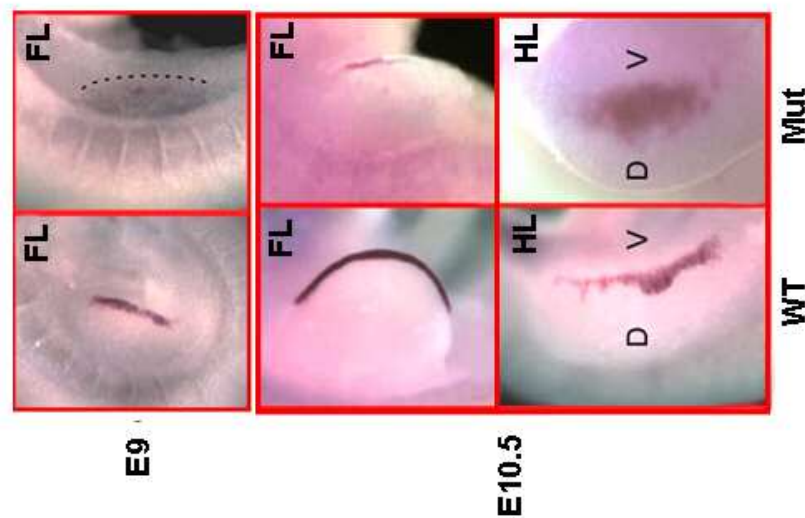
**Fig.21 Localizzazione di Pbx2 negli arti anteriori e posteriori al giorno E10.5.** Reazioni di immunohistochimica, effettuate con anticorpo specifico per Pbx2, evidenziano che sia negli arti anteriori (FL) che in quelli posteriori (HL) tale proteina e' localizzata nella cresta ectodermica apicale (AER) e nella regione distale dove forma un collare che circonda l'area mesenchimale più centrale dell'abbozzo degli arti (HL a-b)



**Fig.22 Ibridazione *in situ* con *Fgf10*.** Al giorno E9.5 gli arti anteriori *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/-</sup> (FL Mut) sono risultati completamente privi di segnale *Fgf10*, mentre analisi effettuate su embrioni mutanti al giorno E10.5 hanno mostrato un'espressione di *Fgf10* ridotta sia negli arti anteriori che posteriori (HL)

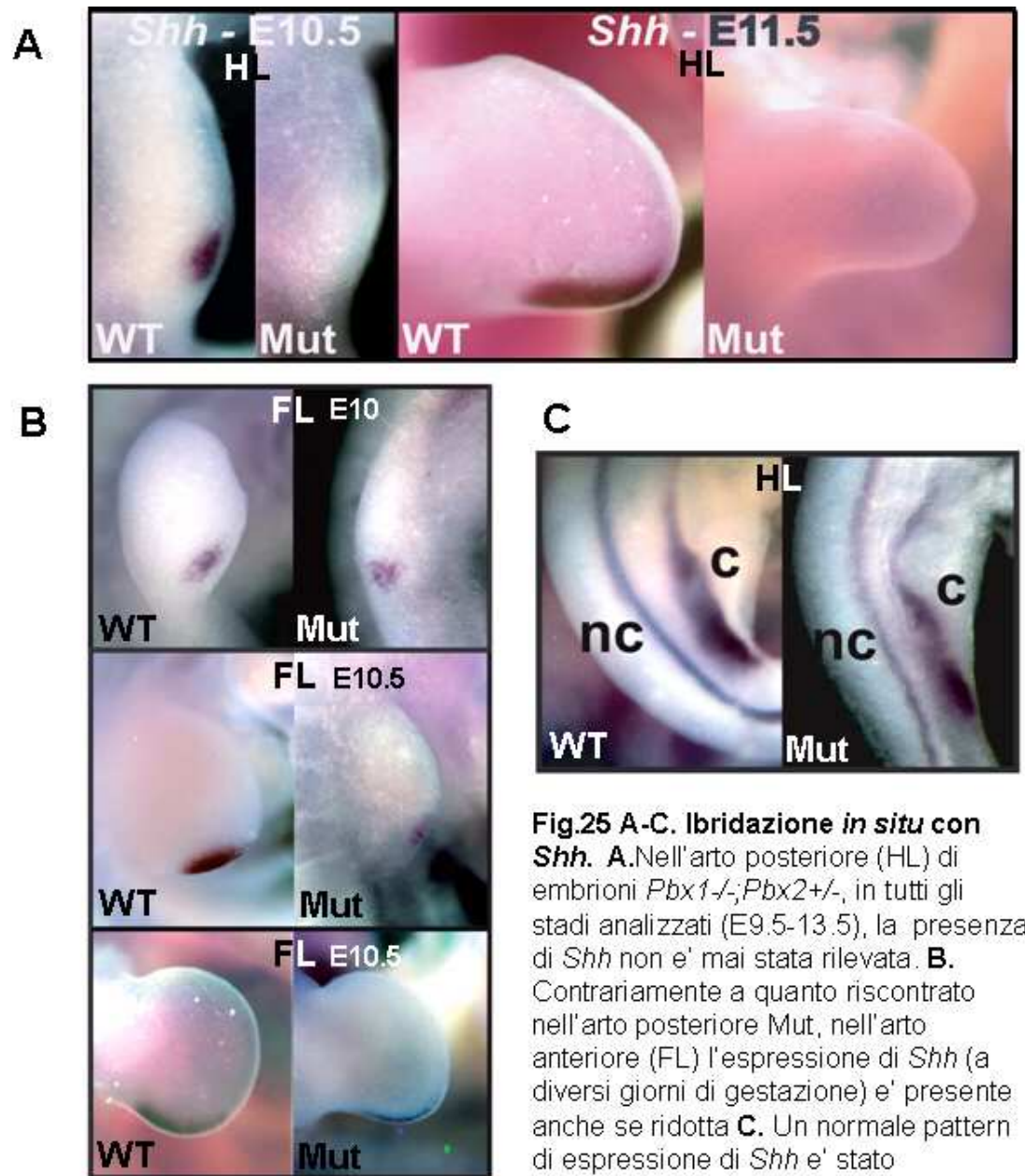


**Fig.23 Ibridazione *in situ* con *Tbx4*.** L'analisi degli arti posteriori (HL) *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/-</sup> (Mut) con *Tbx4* al giorno E10.5, ha rivelato un pattern di espressione relativamente normale.

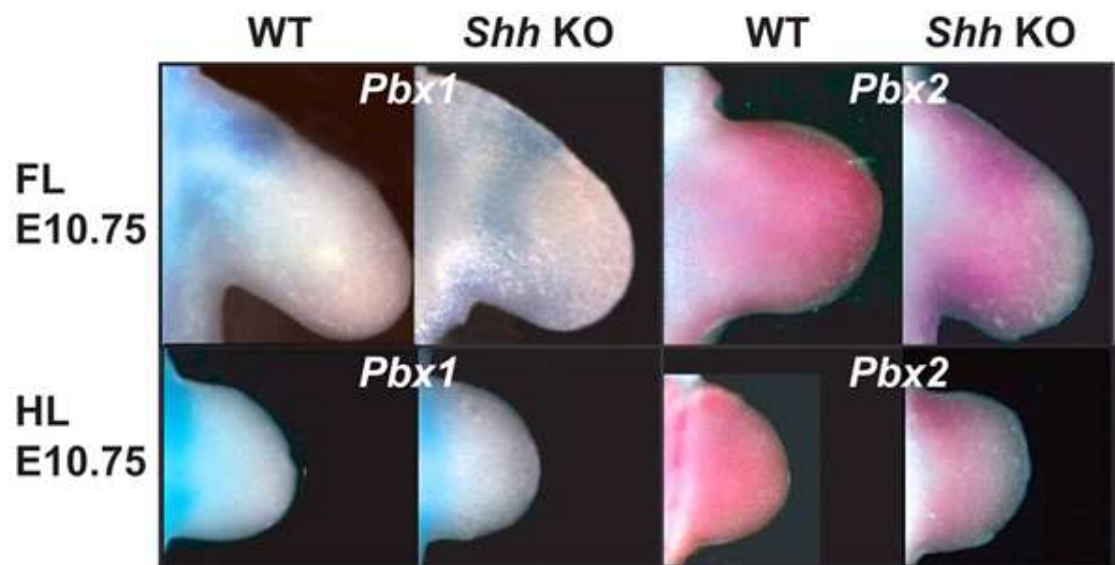


**Fig.24 Ibridazione *in situ* con *Fgf8*** Analisi di espressione di *Fgf8*, effettuate su embrioni *Pbx1*<sup>-/-</sup>; *Pbx2*<sup>+/-</sup> (Mut) al giorno E9, hanno mostrato che *Fgf8* è quasi assente nell'AER di arti anteriori (FL), mentre al giorno E10.5 è ridotto ed anteriorizzato. Allo stadio E10.5 gli arti posteriori Mut mostrano un'espressione di *Fgf8* ridotta antero – posteriormente.

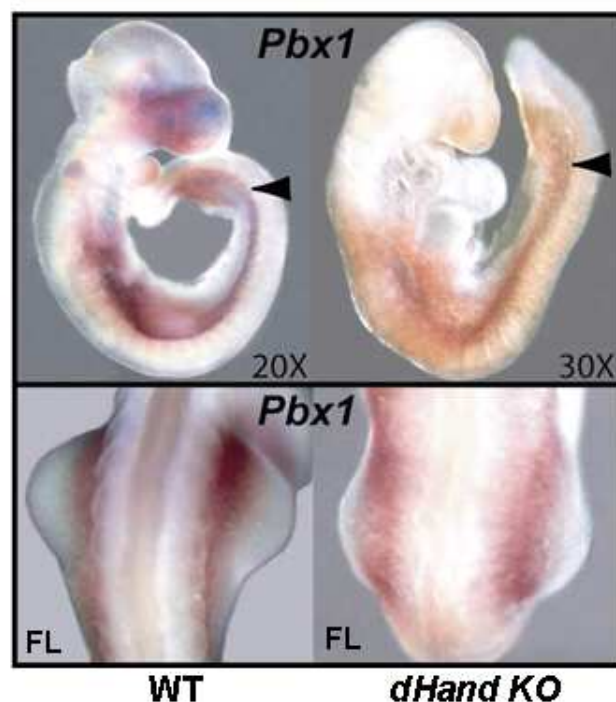




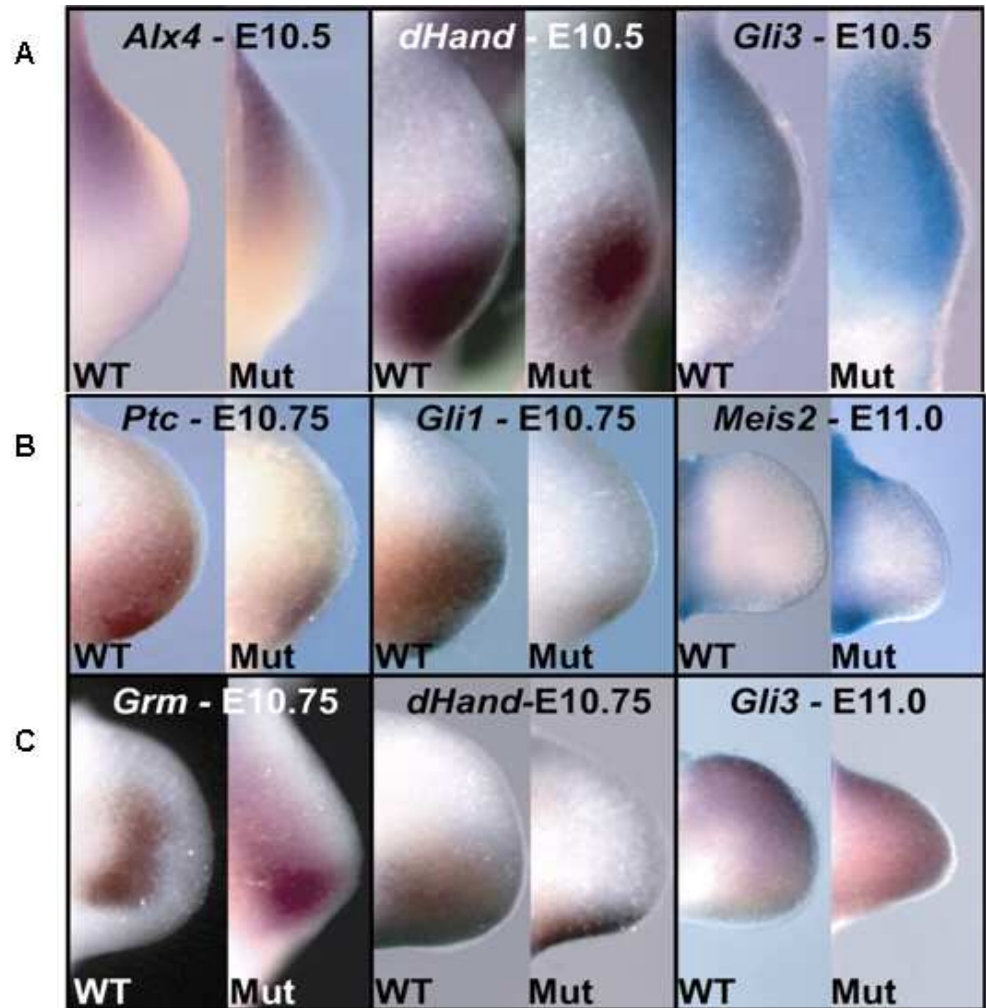
**Fig.25 A-C. Ibridazione *in situ* con *Shh*.** **A.** Nell'arto posteriore (HL) di embrioni *Pbx1*<sup>-/-</sup>;*Pbx2*<sup>+/-</sup>, in tutti gli stadi analizzati (E9.5-13.5), la presenza di *Shh* non e' mai stata rilevata. **B.** Contrariamente a quanto riscontrato nell'arto posteriore Mut, nell'arto anteriore (FL) l'espressione di *Shh* (a diversi giorni di gestazione) e' presente anche se ridotta. **C.** Un normale pattern di espressione di *Shh* e' stato evidenziato a livello della cloaca (c) e della notocorda (n) di embrioni Mut al giorno E10.



**Fig.26 Espressione di *Pbx1* e *Pbx2* in arti *Shh*<sup>-/-</sup> (KO).** In arti sia anteriori (FL) che posteriori (HL) *Shh*<sup>-/-</sup>, l'espressione di *Pbx1* e *Pbx2* risulta invariata nonostante l'anormale morfologia ed una riportata apoptosi distale (Chiang et al., 2001).

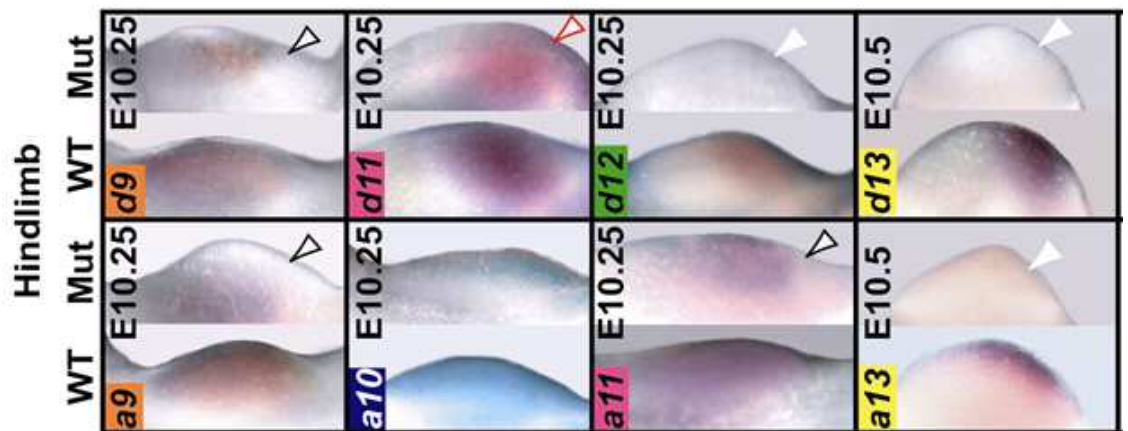


**Fig.27 Espressione di *Pbx1* in embrioni *dHand*<sup>-/-</sup> (KO).** Il pattern di espressione di *Pbx1* risulta normale in arti *dHand* KO sia posteriori (HL e frecce nere nei pannelli superiori) che anteriori (FL)



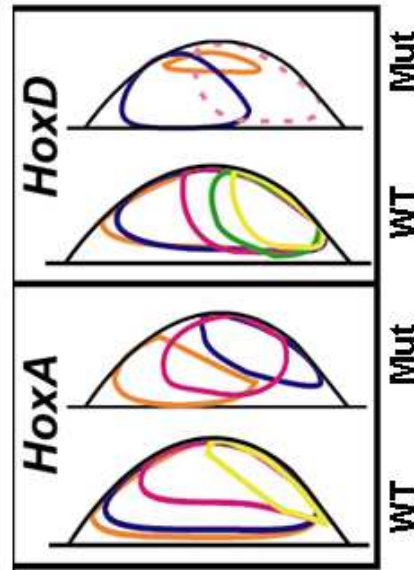
**Fig.28 Espressione di geni mesenchimali negli arti posteriori *Pbx1*<sup>-/-</sup>;*Pbx2*<sup>+/-</sup>**  
**A.** Analisi effettuate ad uno stadio che precede l'induzione di *Shh* in arti posteriori *Pbx1*<sup>-/-</sup>;*Pbx2*<sup>+/-</sup> rivelano livelli di espressioni di *Gli3*, *dHand* ed *Alx4* comparabili a quelli ottenuti nei wild type. **B** I livelli di espressione di *Ptc* e *Gli1* sono drasticamente ridotti, mentre il pattern di espressione di *Meis2* e' preservato. **C** Analisi effettuate a giorni gestazionali tardivi (E10.75) indicano che l'espressione di *Grm* e' posteriorizzata, quella di *Gli3* diffusa posteriormente e *dHand* risulta downregolato.



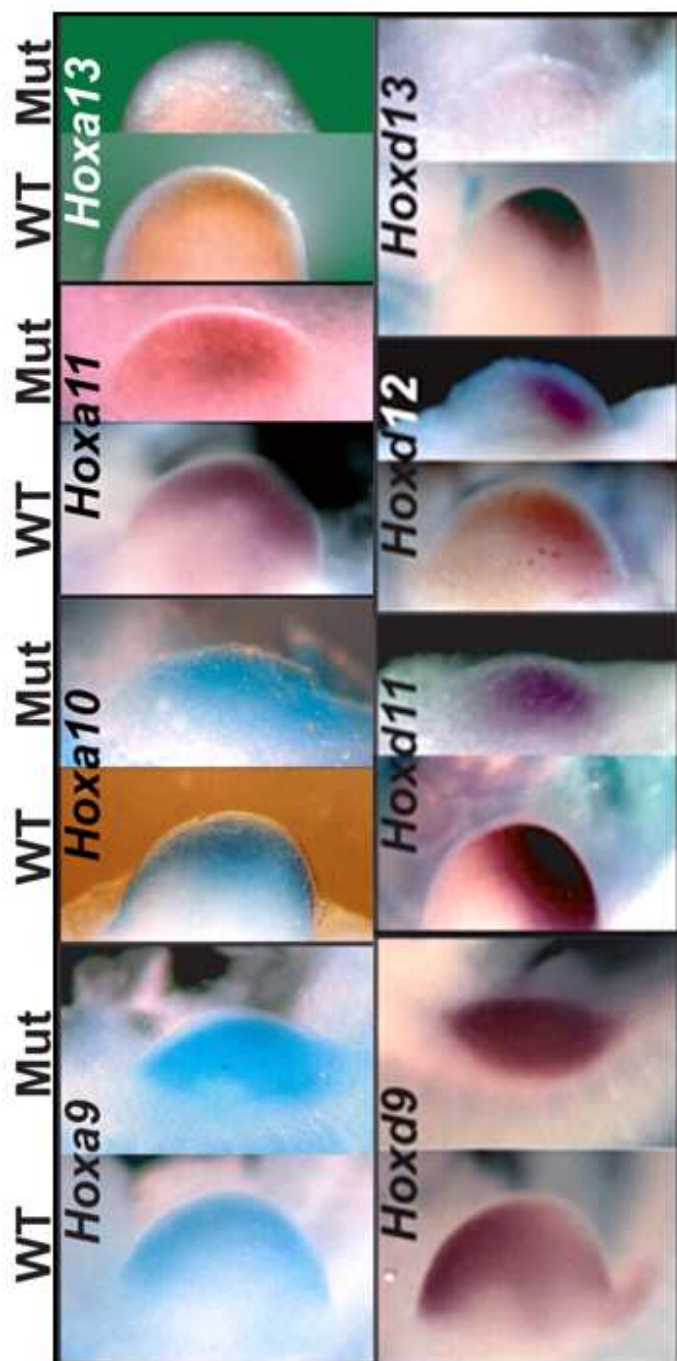


**Fig.29** Espressione di geni *Hox* in arti posteriori *Pbx1<sup>-/-</sup>;Pbx2<sup>+/-</sup>* (Mut) al giorno E10.5.

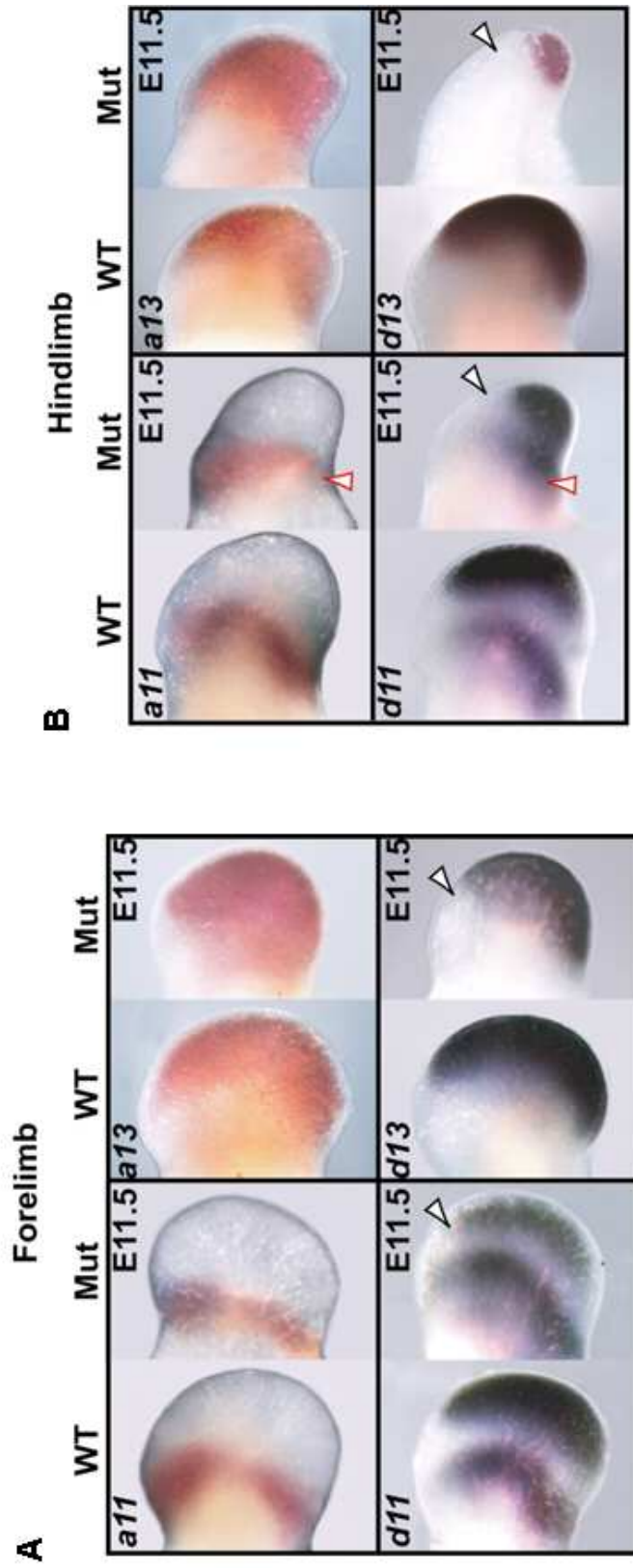
L' espressione dei geni al 5' *Hoxd* ad uno che precede l'induzione di *Shh* (E10.25-10.5) appare assente o ridotta in arti posteriori Mut (hindlimb) nonostante il preservato sviluppo morfologico. Le frecce nere indicano l'assenza di espressione nel dominio posteriore dell'arto (*Hoxa9*, *Hoxa11*, *Hoxd9*), le frecce rosse indicano riduzione dell'espressione nel dominio posteriore (*Hoxd11*) e le frecce bianche indicano la completa assenza di espressione (*Hoxa13*, *Hoxd12*, *Hoxd13*).



**Diagramma della distribuzione degli *HoxA* ed *HoxD* negli arti *Pbx1<sup>-/-</sup>;Pbx2<sup>+/-</sup>* (Mut).** Il diagramma rappresenta la *summa* delle espressioni degli *Hoxd* analizzati, ottenute a due giorni di gestazione diversi (E10.25 e E10.5): il dominio di espressione di ogni *Hox* e' rappresentato dallo stesso colore della nomenclatura utilizzata nei pannelli di ibridazione *in situ* dei singoli *Hox*. Le linee tratteggiate nel Mut indicano ridotta espressione per *Hoxd11* (rosa), mentre l'assenza di linee riflette l'assenza di espressione (*Hoxa13*, *Hoxd12*, *Hoxd13*). Le linee blue nel diagramma *HoxD* rappresentano l'espressione di *Hoxd10* la cui *in situ* non e' mostrata.



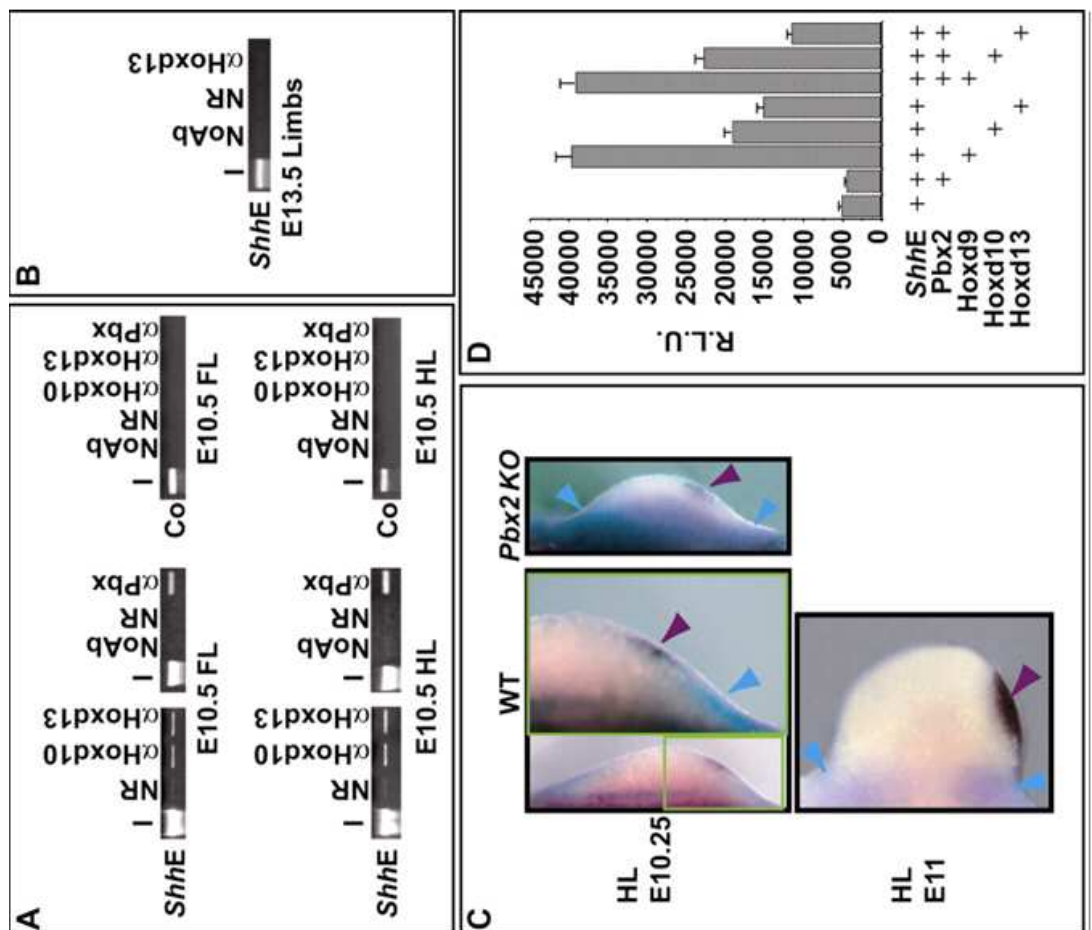
**Fig.30 Espressione di geni Hox in arti posteriori *Pbx1*<sup>-/-</sup>*Pbx2*<sup>+/-</sup> (Mut) al giorno E10.5.**  
 L'espressione di *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Hoxa11*, *Hoxa13*, *Hoxd9*, *Hoxd11* e *Hoxd13* è invariata in arti anteriori (forelimb), mentre *Hoxa13* ed *Hoxd13* sono assenti



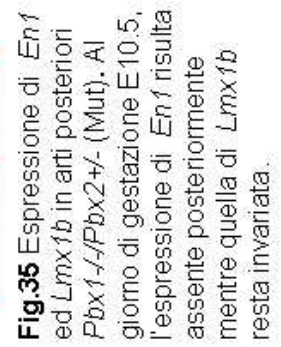
**Fig.31 Espressione dei geni al 5' HoxA ed HoxD al giorno E11.5**

**A** L'espressione dei geni al 5' HoxA (*a11*, and *a13*) in arti anteriori (forelimb) Mut al giorno di gestazione E11.5 risulta alquanto invariata. L'espressione, invece, dei geni al 5' HoxD (*d11* and *d13*) appare lievemente ridotta anteriormente. Le frecce nere indicano la riduzione di espressione anteriore (*Hoxd11* e *Hoxd13*). **B** L'espressione dei geni al 5' HoxA (*a11*, and *a13*) in arti posteriori (hindlimb) Mut al giorno di gestazione E11.5 risulta alquanto invariata. L'espressione, invece, dei geni al 5' HoxD (*d11* and *d13*) appare severamente ridotta anteriormente. Le frecce nere indicano la perdita di espressione anteriore (*Hoxd11* e *Hoxd13*), mentre le frecce rosse indicano una espressione prossimale posteriore lievemente alterata (*Hoxa11* and *Hoxd11*).





**Fig.32 Le proteine Hoxd10 e d13 mostrano capacita' di legare l'enhancer di *Shh* (*ShhE*).**  
**A** Analisi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) su abbozzi di arti anteriori e posteriori di topo al giorno E10.5, usando antisieri specifici contro Hoxd10, d13 e Pbx dimostrano che sia gli Hox che i Pbx sono effettivamente capaci di legare in vivo *ShhE*. La specificita' di legame degli anticorpi testati e' stata verificata attraverso la mancata amplificazione per PCR (Co in A) di una sequenza di 1.4Kb a monte del *ShhE*. **B** ChIP con Hoxd13 su un pool di abbozzi di arti anteriori e posteriori di al giorno E13.5, conduce alla mancata amplificazione di alcuna sequenza, ne' quella *ShhE* specifica (372bp), ne' quella 1.4Kb a monte dell'enhancer.  
**C** Esperimenti di doppia ibridazione *in situ* utilizzando arti posteriori di topi WT al giorno di gestazione E10-E11 e sonde specifiche per *Pbx1* (bordeaux) e *Shh* (celeste), dimostrano che *Pbx1* non co-localizza con *Shh* ne' in un background WT, ne' tantomeno in quello *Pbx2*<sup>-/-</sup>. **D** In cellule di carcinoma embrionale (P19) le proteine Hoxd9, d10 e d13 legano l'enhancer di *Shh*, attivando la trascrizione rispettivamente di: 8-, 4-, e 3-fold.  
**E** Cellule P19 sono state co-trasfettate con vettori di espressione codificanti *Pbx2*, Hoxd9, Hoxd10, and Hoxd13 (secondo lo schema riportato) in presenza di un vettore recante il gene della luciferasi posto sotto il controllo dell'enhancer di *Shh* (pT81m*ShhE*). L'attivita' luciferasica, misurata in estratti proteici da tali cellule, e' qui riportata in barre sperimentali. Il valore medio, in unita' arbitrarie (R.L.U.), ottenuto da quattro esperimenti indipendenti.



**Fig.34 Espressione dei geni coinvolti nel feedback *Shh/Fgf4*: *Gremlin* e *Bmp*.**  
**A.** *Gremlin* appare ridotto in arti anteriori (FL) *Pbx1-4/Pbx2+/-* (Mut), mentre in quelli posteriori (HL) la sua espressione è posteriorizzata. **B.** Il pattern di espressione di *BMP2*, al giorno E10.5, risulta essere ridotto e diffuso negli arti posteriori (HL) Mut.

**Fig.33 Ibridazione *in situ* con *Fgf4*.** Al giorno E10.5 l'AER di arti anteriori (FL) *Pbx1-4/Pbx2-4* (Mut) risultano completamente privi di espressione per *Fgf4*, mentre al giorno E11.5 tale gene mostra un'espressione "interrotta". L'espressione di *Fgf4* nell' AER di arti posteriori (HL) Mut al giorno E11.5 e' localizzata solo posteriormente

## **CAPITOLO VIII**

### **BIBLIOGRAFIA**

**Agarwal P, Wylie JN, Galceran J, Arkhitko O, Li C, Deng C, Grosschedl R, Bruneau BG.** Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo *Development*. 2003 Feb;130(3):623-33.

**Ahn K, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR, Crenshaw EB 3rd.** BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development*. 2001 Nov;128(22):4449-61.

**Ahn S, Joyner AL.** Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell*. 2004 Aug 20;118(4):505-16.

**Altabef M, Clarke JD, Tickle C.** Dorso-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development*. 1997 Nov;124(22):4547-56.

**Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL.** Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development*. 2002 Oct;129(20):4753-61.

**Berthelsen J, Vandekerkhove J, Blasi F.** Purification and characterization of UEF3, a novel factor involved in the regulation of the urokinase and other AP-1 controlled promoters. *J Biol Chem*. 1996 Feb 16;271(7):3822-30.

**Berthelsen J, Zappavigna V, Mavilio F, Blasi F.** Prep1, a novel functional partner of Pbx proteins. *EMBO J*. 1998 Mar 2;17(5):1423-33.

**Berthelsen J, Kilstrup-Nielsen C, Blasi F, Mavilio F, Zappavigna V.** The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes Dev*. 1999 Apr 15;13(8):946-53.

**Burglin TR.** Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* 1997 Nov 1;25(21):4173-80.

**Capdevila J, Tsukui T, Rodriquez Esteban C, Zappavigna V, Izpisua Belmonte JC.** Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Mol Cell.* 1999 Nov;4(5):839-49.

**Chang CP, Brocchieri L, Shen WF, Largman C, Cleary ML.** Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1734-45.

**Chang CP, Jacobs Y, Nakamura T, Jenkins NA, Copeland NG, Cleary ML.** Meis proteins are major in vivo DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Mol Cell Biol.* 1997 Oct;17(10):5679-87.

**Charite J, de Graaff W, Shen S, Deschamps J.** Ectopic expression of Hoxb-8 causes duplication of the ZPA in the forelimb and homeotic transformation of axial structures. *Cell.* 1994 Aug 26;78(4):589-601.

**Charite J, McFadden DG, Olson EN.** The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development.* 2000 Jun;127(11):2461-70.

**Chen H, Ovchinnikov D, Pressman CL, Aulehla A, Lun Y, Johnson RL.** Multiple calvarial defects in *Imx1b* mutant mice. *Dev Genet.* 1998;22(4):314-20.

**Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA.** Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* 1996 Oct 3;383(6599):407-13.

**Chiang C, Litingtung Y, Harris MP, Simandl BK, Li Y, Beachy PA, Fallon JF.** Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol.* 2001 Aug 15;236(2):421-35.

**Crossley PH, Minowada G, MacArthur CA, Martin GR.** Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell.* 1996 Jan 12;84(1):127-36.



**Dahn RD, Fallon JF.** Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science*. 2000 Jul 21;289(5478):438-41.

**Dolle P, Dierich A, LeMeur M, Schimmang T, Schuhbaur B, Chambon P, Duboule D.** Disruption of the Hoxd-13 gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell*. 1993 Nov 5;75(3):431-41.

**Duboule D.** How to make a limb? *Science*. 1994 Oct 28;266(5185):575-6.

**Dudley AT, Ros MA, Tabin CJ.** A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature*. 2002 Aug 1;418(6897):539-44.

**Fallon JF, Lopez A, Ros MA, Savage MP, Olwin BB, Simandl BK.** FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science*. 1994 Apr 1;264(5155):104-7.

**Ferretti E, Schulz H, Talarico D, Blasi F, Berthelsen J.** The PBX-regulating protein PREP1 is present in different PBX-complexed forms in mouse. *Mech Dev*. 1999 May;83(1-2):53-64.

**Ferretti E, Marshall H, Popperl H, Maconochie M, Krumlauf R, Blasi F.** Segmental expression of Hoxb2 in r4 requires two separate sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and Hox proteins. *Development*. 2000 Jan;127(1):155-66.

**Fromental-Ramain C, Warot X, Messadecq N, LeMeur M, Dolle P, Chambon P.** Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development*. 1996 Oct;122(10):2997-3011.

**Geduspan JS, MacCabe JA.** The ectodermal control of mesodermal patterns of differentiation in the developing chick wing. *Dev Biol*. 1987 Dec;124(2):398-408.

**Gehring WJ, Affolter M, Burglin T.** Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:487-526.

**Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wuthrich K.** Homeodomain-DNA recognition. *Cell*. 1994 Jul 29;78(2):211-23.

**Gilbert S.F.** (1995). *Developmental Biology*, Seventh Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.

**Gonzalez-Crespo S, Abu-Shaar M, Torres M, Martinez-A C, Mann RS, Morata G.** Antagonism between extradenticle function and Hedgehog signalling in the developing limb. *Nature*. 1998 Jul 9;394(6689):196-200.

**Grieshammer U, Minowada G, Pisenti JM, Abbott UK, Martin GR.** The chick limbless mutation causes abnormalities in limb bud dorsal-ventral patterning: implications for the mechanism of apical ridge formation. *Development*. 1996 Dec;122(12):3851-61.

**Harfe BD, Scherz PJ, Nissim S, Tian H, McMahon AP, Tabin CJ.** Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell*. 2004 Aug 20;118(4):517-28.

**Izpisua-Belmonte JC, Falkenstein H, Dolle P, Renucci A, Duboule D.** Murine genes related to the *Drosophila* AbdB homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J*. 1991 Aug;10(8):2279-89.

**Jacobs, Y., Schnabel, C. A. and Cleary, M. L..** Trimeric association of Hox and TALE homeodomain proteins mediates Hoxb2 hindbrain enhancer activity. *Mol Cell Biol* (1999) 19, 5134-42.

**Kamps, M. P., Murre, C., Sun, X. H. and Baltimore, D..** A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* (1990) 60, 547-55.

**Kengaku M, Capdevila J, Rodriguez-Esteban C, De La Pena J, Johnson RL, Belmonte JC, Tabin CJ.** Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science*. 1998 May 22;280(5367):1274-7.

**Kilstrup-Nielsen, C., Alessio, M. and Zappavigna, V.** PBX1 nuclear export is regulated independently of PBX-MEINOX interaction by PKA phosphorylation of the PBC-B domain. *EMBO J* (2003) 22, 89-99.

**Kim, S. K., Selleri, L., Lee, J. S., Zhang, A. Y., Gu, X., Jacobs, Y. and Cleary, M. L..** Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in *lpf1*-deficient mice promotes diabetes mellitus. *Nat Genet* (2002) 30, 430-5.

**Kimmel RA, Turnbull DH, Blanquet V, Wurst W, Loomis CA, Joyner AL.** Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev.* 2000 Jun 1;14(11):1377-89.

**Kmita M, Fraudeau N, Herault Y, Duboule D.** Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of Hoxd genes in limbs. *Nature.* 2002 Nov 14;420(6912):145-50.

**Knoepfler, P. S., Calvo, K. R., Chen, H., Antonarakis, S. E. and Kamps, M. P..** Meis1 and pKnox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94, 14553-8.

**Koussoulakos S, Sharma KK, Anton HJ.** Effect of vitamin A on wound epidermis during forelimb regeneration in adult newts. *Int J Dev Biol.* 1990 Dec;34(4):433-9.

**Kraus P, Fraidenraich D, Loomis CA.** Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech Dev.* 2001 Jan;100(1):45-58.

**Krumlauf, R..** Hox genes in vertebrate development. *Cell* (1994) 78, 191-201.

**LaRonde-LeBlanc, N.A. and Wolberger, C.** Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev* (2003). 17, 2060-72.

**Kurant E, Pai CY, Sharf R, Halachmi N, Sun YH, Salzberg A.** Dorsotonal/homothorax, the Drosophila homologue of meis1, interacts with extradenticle in patterning of the embryonic PNS. *Development.* 1998 Mar;125(6):1037-48.

**Laufer E, Nelson CE, Johnson RL, Morgan BA, Tabin C.** Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell.* 1994 Dec 16;79(6):993-1003.

**Lettice LA, Heaney SJ, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE, de Graaff E.** A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet.* 2003 Jul 15;12(14):1725-35.

**Litington Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C.** Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*. 2002 Aug 29;418(6901):979-83. Epub 2002 Aug 18.

**Loomis CA, Harris E, Michaud J, Wurst W, Hanks M, Joyner AL.** The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature*. 1996 Jul 25;382(6589):360-3.

**Lopez-Martinez A, Chang DT, Chiang C, Porter JA, Ros MA, Simandl BK, Beachy PA, Fallon JF.** Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic hedgehog cleavage. *Curr Biol*. 1995 Jul 1;5(7):791-6.

**Lu, J., Chang, P., Richardson, J. A., Gan, L., Weiler, H. and Olson, E. N.** The basic helix-loop-helix transcription factor capsulin controls spleen organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000). 97, 9525-30.

**Maden M.** The effect of vitamin A on the regenerating axolotl limb. *J Embryol Exp Morphol*. 1983 Oct;77:273-95.

**McGinnis, W., Levine, M., Hafen, E., Kuroiwa, A. and Gehring, W..** A conserved DNA sequence found in the homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and Bithorax complex. *Nature* (1984) 308, 428-33.

**McGinnis, W. and Krumlauf, R..** Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 6(1992) 8, 283-302.